

生命科学实验指南系列



Short Protocols in Human Genetics

精编人类遗传学实验指南

N. C. 德拉科波利 J. L. 海恩斯 B. R. 科夫
〔美〕 C. C. 莫顿 A. 罗森茨威格 C. E. 塞德曼 编著
J. G. 塞德曼 D. R. 史密斯
夏家辉 主译



科学出版社

(Q-2145.31)



生命科学实验指南系列·典藏版

图解微生物实验指南
免疫学技术及其应用
生物衰老：研究方法与实验方案
精编细胞生物学实验指南
植物蛋白质组学实验指南
蛋白质纯化指南（原书第二版）
环境基因组学实验指南
实验动物血液生理生化参考手册
生理学实验指南
精编免疫学实验指南
酵母遗传学方法实验指南
人干细胞培养
抗体制备及使用实验指南
病毒的电子显微学研究
植物生物学与生态学实验
神经生物学实验原理与技术
DNA微阵列实验指南
基因转移：DNA和RNA的转运与表达
生物实验室管理手册（原书第二版）
精编人类遗传学实验指南
单分子技术实验指南
现代蛋白质工程实验指南
活细胞成像（原书第二版）
遗传变异分析实验指南
表皮细胞实验指南
分子克隆实验指南（原书第三版）（上下册）
精编分子生物学实验指南（原书第五版）
现代神经科学研究技术
生命科学实验设计指南
现代生物化学与分子生物学仪器与设备
分子细胞遗传学——技术和应用
精编蛋白质科学实验指南
实验细胞资源的描述标准与管理规范
实验动物设施运行管理指南
元基因组学：方法和步骤（影印版）
现代工业微生物学实验技术
真核生物转录调控——概念策略与技术（原书第二版）
动物细胞培养——基本技术和特殊应用指南（原书第六版）



科学出版中心 生物分社
联系电话：010-64012501
E-mail：lifescience@mail.sciencep.com
网址：http://www.lifescience.com.cn
销售分类建议：分子生物技术


赛拉艾芙
生命科学订阅号


ISBN 978-7-03-047486-5
定价（全套）：4500.00元

生命科学实验指南系列·典藏版

精编人类遗传学实验指南

Short Protocols in Human Genetics

〔美〕 N.C.德拉科波利 J.L.海恩斯 B.R.科夫 C.C.莫顿 A.罗森茨威格 C.E.塞德曼 J.G.塞德曼 D.R.史密斯 编著

夏家辉 主译

科学出版社

北京

图字：01-2005-3955 号

内 容 简 介

“生命科学实验指南系列”图书均出自名家，包括众多从 Cold Spring Harbor Laboratory Press 和 John Wiley & Sons 等国际知名出版社引进的实验室必备工具书，是生命科学领域最先进、实用、权威的实验手册类优秀图书。该系列图书简单明了，囊括了全世界最著名的生物类实验室操作方法，无论是初学者还是需要深入研究的科研工作者都能从中获益。该系列图书在读者群中有较高的知名度和美誉度，特别是以《分子克隆实验指南》和《精编分子生物学实验指南》为代表，堪称经典，分别被喻为生命科学领域的“蓝宝书”和“红宝书”。现挑选其中的精品集结成典藏版。

图书在版编目（CIP）数据

生命科学实验指南系列：典藏版/雷东锋等编著. —北京：科学出版社，2016
ISBN 978-7-03-047486-5

Ⅰ.①生… Ⅱ.①雷… Ⅲ. ①生命科学–实验–指南 Ⅳ.①Q1-0

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 043878 号

责任编辑：王 静 李 悦
责任印制：张 伟 / 封面设计：刘新新

科学出版社 出版
北京东黄城根北街 16 号
邮政编码：100717
http://www.sciencep.com

北京厚诚则铭印刷科技有限公司 印刷
科学出版社发行 各地新华书店经销
*
2016 年 7 月第 一 版 开本：787×1092 1/16
2016 年 7 月第一次印刷 印张：1310 1/2
字数：31 074 000
定价：4500.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换)

译者名单

主　译：夏家辉

副主译：夏　昆

译　者：夏家辉　夏　昆　梁德生　邬玲仟　戴和平
潘　乾　龙志高　胡正茂　刘雄昊　向新颖
凌　捷　谭洁琼　薛金锋　李　薇　迟静薇
谢志国

所在单位：中南大学医学遗传学国家重点实验室

译 者 序

现代人类遗传学的发展极为迅速，加快人类遗传学理论及实验方法的更新能够更大地促进该学科的发展。《精编人类遗传学实验指南》一书详细介绍了基因定位、基因分型、体细胞杂交、细胞遗传学、大片段的克隆和分析、确定基因组 DNA 候选基因、候选基因法寻找突变、临床细胞遗传学、临床分子遗传学、癌基因组学、转录谱、基因治疗载体、基因治疗等人类遗传学相关内容，这些内容构成了现代人类遗传学的精髓。

本书作者 Nicholas C. Dracopoli 等通过丰富、翔实的理论及最新实验技术，以一种新的方式系统介绍了全部现代人类遗传学的理论及实验技术，以及最新的实验室方法，集科学性、系统性、指导性、实用性、方便性、有效性于一体。同时，该书还具有广泛的推广性，适于从事遗传学相关专业研究的研究人员、临床医生，特别是临床遗传专科医生以及各类农、林、医类院校不同层次和不同专业的本科生、研究生使用。希望通过翻译该书并且出版，为中国人类遗传学的发展及科研水平的提高带来质的飞跃。

此外，人类遗传学作为一门发展极为迅速的学科，近年来新的理论和技术层出不穷，如芯片技术、高通量测序技术等，这些新技术极大地促进了人类遗传学乃至生命科学的飞跃。我们相信作者在今后必然会在本书中增加更多的新内容，我们也将在再版时将其增补，力求让该书成为一本广大科研工作者喜爱的工具书。

在该书翻译、审校过程中，得到了科学出版社和中南大学医学遗传学国家重点实验室全体师生的鼎力协助，在此表示衷心感谢，更加感谢各位译者在百忙中的辛勤工作，由于时间仓促，译文难免有不妥之处，敬请各位读者、同仁提出宝贵意见，以便再版时加以更正完善。

夏家辉

中国工程院院士

2008 年 11 月于长沙

前 言

20 世纪末是分子医学的开始。分离和纯化基因、测定基因的结构和调节、发现具有致病性的基因变异成为研究生物和疾病的有力手段。遗传学分析技术不仅对遗传学家，而且对未经历过专门的遗传学训练的科学家及临床研究者也变得越来越重要。

《精编人类遗传学实验指南》汇集了 *Current Protocols in Human Genetics*（以下简称 CPHG）中所发表的各种方法的精简版本。本书一步一步介绍了 CPHG 的一些基本原理方法。CPHG 涉及的范围是很广的，包括遗传学的方法比如遗传连锁分析、基因克隆、细胞遗传学以及诊断学。本书是专门为实验室工作编写的参考书，适用于对 CPHG 比较熟悉的研究生及博士后。同时，本书也提供了足够的信息给有经验的研究人员作为实验指南。如果需要更多的信息，建议读者进一步参考 CPHG。

本书并不可替代人类遗传学的正规教材。许多最近出版的书籍提供了完整的人类遗传学理论和知识，其中既包括经典遗传学方面，也包括了分子遗传学的内容（比如 Thomas D. Gelehrter 等出版的 *Principles of Medical Genetics*、Robert L. Nussbaum 等出版的 *Thompson & Thompson Genetics in Medicine*、Tom Strachen 等出版的 *Human Molecular Genetics*、D. J. J. Weatherall 等出版的 *The New Genetics in Clinical Principles*）。David L. Rimoin 等出版的 *Emery and Rimoins Principles and Practice of Medical Genetics* 则更注重于临床及医学遗传学。最后需要提到的是 OMIM（*Online Medelian Inheritance in Man*），该著作提供了人类遗传学不可替代和缺少的条目，并且包含了最新的基因缺陷及相关疾病的列表和信息，该著作最早由 Victor A. McKusick 和他在 Johns Hopkins 大学和其他地方的同事与合作者们编著并出版，现已被 NCBI（The National Center for Biotechnology Information）进一步发展到了互联网。

如何使用本实验指南

本书的构成

本手册中的所有主题均按章节顺序排列，而实验方案在每章中自成一小节；每个小节都描述了一种实验技术的一个或多个实验方案，每个实验方案都由实验材料、实验步骤以及参考文献等几部分组成。所有的参考文献可以在本书末的“参考文献”部分找到。本书中所有内容的组织顺序都参照 CPHG 一书，只是每章中各个独立小节的顺序并不严格参照 CPHG，每节的标题均与 CPHG 完全一致，所以同时拥有这两本书的读者如需就某些书中细节部分进一步阅读时，能够很方便地将本书与 CPHG 一书前后参照阅读。

由于许多试剂与实验过程在本书中多次反复出现，各小节间使用了大量前后参照以避免赘述。前后参照避免那些因为包含了如何准备原始材料和数据分析这些辅助过程的描述变得很长很复杂，使实验方案看上去不至于太长。某些描述常规技术的特定章节（例如凝胶电泳）出现在谈及它们被如何应用的其他章节中时也使用了前后参照。某些

常用技术（例如 DNA 定量）见“附录 3”；对于分子生物学和细胞生物学实验要用到的大部分方法，读者可以参考 *Current Protocols in Molecular Biology* 和 *Current Protocols in Cell Biology* 两本书。

实验指南

本书中许多小节都包含了大量实验方案，每个实验方案代表一系列操作步骤。每小节中首先给出了“基本实验方案”，通常是指被推荐的或最广泛使用的实验方法。接下来是“备选实验方案”——当使用不同设备和试剂可以达到相同的结果，或不同的起始材料要求在方法中做相应改变，或最终产物的要求与基本实验方案不同时——使用“备选实验方案”。“支持实验方案”则描述了操作“基本实验方案”或“备选实验方案”时需要添加的额外步骤；把这些步骤从核心步骤中分离是因为它们可能被应用于本书中的其他方面，或者因为它们在时序上与基本步骤分离。

试剂与溶液

实验方案中需要用到的所有试剂均在每个实验过程开始之前的材料清单中一一列出。大部分是常规储存液，其余是一些常用缓冲液和培养基，还有一些是特定实验方法需要使用的特殊溶液。所有溶液的配方见附录 1。需要特别注意的是：某些在不同章节中都出现了的名称相同的溶液（例如裂解液），其配方是不同的。为了避免混淆，除了如 TE 缓冲液这类常见溶液或缓冲液，附录 1 中每个试剂的配方都在其名称旁用括号注明了出自的章节。

设备

特殊设备和用品在每个实验方案的材料清单中一一列出。我们没有试图列出每个实验步骤中需要用到的全部物品，而是选择列出那些在实验室中可能没有准备好的物品、特殊规格的设备或者需要特别处理的物品。

现代人类遗传学与分子遗传学实验室需要用到的每一件标准设备请见列表。这些物品在本书中广泛使用，无需在每个实验方案之前的材料清单中一一列出。

棉签，木质棉棒	小型离心机，Eppendorf 型，最大离心速度 12 000～14 000r/min
高压灭菌器	离心管，1.5ml
封袋机	显微镜，亮视野，非倒置
天平，分析和制备	显微镜玻片，玻璃制，75mm×25mm，加盖玻片
烧杯	研钵与研杵
工作台保护面	杂交炉，干燥，杂交，有微波；
生物危险品处理容器和塑料袋	裁纸刀，大号
生物安全柜，保护研究人员免受生物危害	纸巾
瓶，玻璃和塑料喷嘴	封口膜
煤气灯	巴斯特移液管和球吸管
细胞收集器，用于检测 96 孔微量滴定板中培养物的放射活性	pH 计

续表

夹子	pH 试纸
CO_2 湿度培养箱，37℃，5%CO_2	吸管，无菌的莫尔吸管、巴斯德吸管
计算机，PC 或 Macintosh 操作系统，以及打印机	移液器，可调节式；量程为 0.5～1.0μl、10～200μl、200～1000μl；
玻片染色缸，玻璃制，用于 75mm×25mm 玻片	塑胶包装纸，（例如 Saran Wrap）
无菌冻存管（例如丹麦 Nunc 公司）	针头钳
小试管、比色杯或电击杯，一次性塑料制品、玻璃以及石英制品	宝丽莱相机
暗房和显影盆	橡皮头玻璃搅棒
干燥器和干燥剂	试管架
干冰	防辐射罩，合成树脂或者胶质玻璃的；
过滤器，用于收集和洗涤硝化纤维或滤膜滤器上的沉淀	放射性墨水
玻璃瓶（例如锥型瓶、平底烧瓶）	放射性物质垃圾桶，液体或固体垃圾用
镊子	冰箱，4℃
分段收集器	环架和环
制冷器	胶塞
通风橱	安全眼镜
盖革计数器，辐（放）射测量仪	刀和刀片
干胶器	闪烁计数器，β 计数和 γ 计数
抛弃式塑胶和石棉手套	剪刀
（刻度）量筒和移液管	振动筛，轨道和台子，室温或 37℃
恒温加热板，用于试管和微量离心管	分光光度计，可见光和 UV
血细胞计数器	Speedvac 蒸发器（Savant 中间件）
冰桶	磁带，遮蔽和电工技师的
制冰器	计时器
37℃保温箱	托盘，塑料和玻璃，各种型号
实验室工作服	UV 交联剂（例如 Stratalinker、Strategene）
无菌层流操作台，用于无菌组织培养	UV 光源，长波长和短波长
看（X）片灯，用于观察放射自显影照片	UV 透明塑料外壳（例如 Saran Wrap）
不含棉绒的纸，例如：Kimwipes 纸巾	UV 透照器
液氮	真空干燥器
冷冻真空干燥器	真空炉
磁力搅拌器，可加热	水浴，37℃
标记，包括永久性标记笔	净水设备
	X 射线感光胶片式暗盒和增感屏

产品生产商

在本书中我们推荐了一些化学药品、生化药品和仪器的生产商。其中提到的某些商家在市场上是拥有最佳质量的商家或者是市场上唯一可用的商家，而另外一些商家是在写作该实验指南的作者的已有经验中仅熟悉的商家。在后一种情况下，作者会给出推荐作为对实验新手购买时的帮助，而对于有经验的研究者则推荐他们使用自己熟悉的商家产品进行实验。

参考文献

本书中的每一小节只给出数量有限的最基本参考文献作为背景知识以供参考，在每

小节的末尾部分列出。全部参考文献则列于本书最后的"参考文献"部分，图表引用的特殊文献也在这部分列出；读者如果想对背景知识的文献和应用方法有更完备的了解，请参考 CPHG 一书的相应章节。

安全性问题

任何操作这些实验的人员都可能遇到以下的危险物品或者具有潜在危险的物品：1）放射性物质；2）有毒化学物质、致癌物、致畸物；3）致病、致感染的生物制剂，包括来自健康人和患者的样品；4）某些重组 DNA 载体。在本书中只给出少量警示语，使用者必须在有一定实验室操作和临床操作经验的基础上谨慎小心地进行实验；使用者还必须了解使用有害物质的危险，并且完全依照国家和当地控制机构编写的安全操作指南进行操作。

致谢

在 John Wiley & Sons 的 *The Current Protocols* 系列丛书的编辑人员们给予的支持和协助下，这本精编实验指南得以撰写成书。此外，我们也得到了 Ann Boyle，Tom Downey，Amy Fluet，Shonda Leonard，Susan Lieberman，Kathleen Morgan，Allen Ranz，Mary Keith Trawick，Joseph White，以及 Elizabeth Harkins 的帮助。我们还要特别感谢为该实验指南贡献了在人类遗传学领域的各种实验方案和宝贵经验的广大同仁——包括在我们实验室，以至在全世界的许多学术性实验室和工程实验室的那些为我们的这本指南提供资料的人们。最后，我们要鸣谢我们的同事 Donald Moir 博士，他是 *Current Protocols in Human Genetics* 的编辑，他对 CPHG 编撰的最初设想和后续增补工作为该书和本书奠定了基础，他为我们这本精编实验指南的编撰提供了无可衡量的帮助。

推荐参考读物

Ausubel，F. M.，Brent，R.，Kingston，R. E.，Moore，D. D.，Seidman，J. G.，Smith，J. A.，Struhl，K.（eds）2004. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley&Sons，New York.

Bonifacino，J. S.，Dasso，M.，Harford，J. B.，Lippincott-Schwartz，J.，and Yamada，K. M.（eds）2004. Current Protocols in Cell Biology. John Wiley&Sons，New York.

Gelehrter，T. D.，Collins，F. S.，and Ginsberg，D. 1997. Principles of Medical Genetics. Lippincott，2nd ed. Williams&Wikins，Baltimore.

Nussbaum，R. L.，McInnes，R. R.，and Willard，H. F. 2004. Genetics in Medicine，6th ed. W. B. Saunders，Philadelphia.

OMIM（Online Mendelian Inheritance in Man）. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi? db=OMIM

Rimoin，D. L.，Connor，J. M.，Pyeritz，R. E.，Korf，B. R.，and Emery，A. E. H.（eds.）2001. Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics，4th

end. Churchill Livingstone, New York.

Strachen, T. and Read, A. P. 2004. Human Molecular Genetics, 3rd ed. Garland Science, New York.

Weatherall, D. J. J. 1992. The New Genetics and Clinical Practice, 2nd ed. Oxford University Press, Oxford.

Nicholas C. Dracopoli
Jonathan L. Haines
Bruce R. Korf
Cynthia C. Morton
Anthony Rosenzweig
Christine E. Seidman
J. G. Seidman
Douglas R. Smith

编写人员

David Adler
University of Washington
Seattle, Washington

Ellen C. Akeson
The Jackson Library
Bar Harbor, Maine

Levent M. Akyurek
National Heart, Lung, and Blood Institute, NIH
Bethesda, Maryland

Lisa M. Albright
Allison Park, Pennsylvania

Becky Alhadeff
New York Blood Center
New York, New York

Christopher I. Amos
University of Texas
M.D. Anderson Cancer Center
Houston, Texas

Wendy Ankener
University of Washington School of Medicine
Seattle, Washington

Michael Arad
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Norman Arnheim
University of Southern California
Los Angeles, California

Arleen D. Auerbach
Rockefeller University
New York, New York

Charles D. Bangs
Stanford University Hospital
Stanford, California

Marie A. Barr
Jefferson Medical College
Philadelphia, Pennsylvania

Scott Barr
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Andreas D. Baxevanis
National Human Genome Research Institute, NIH
Bethesda, Maryland

Stephen B. Baylin
Johns Hopkins Oncology Center
Baltimore, Maryland

Laurie Becker
Case Western Reserve University and University Hospitals
Cleveland, Ohio

Alan H. Beggs
Children's Hospital and Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Helen M. Blau
Stanford University School of Medicine
Stanford, California

Mark S. Boguski
National Center for Biotechnology Information, NIH
Bethesda, Maryland

Richard Bolin
Nexagen
Boulder, Colorado

Anne-Lise Borresen
The Norwegian Radium Hospital
Oslo, Norway

Andrew Braun
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Garrett M. Brodeur
Children's Hospital of Philadelphia
Philadelphia, Pennsylvania

Terry Brown
University of Manchester Institute of Science and Technology
Manchester, United Kingdom

W. Ted Brown
Institute of Basic Research in Developmental Disabilities
Staten Island, New York

Michael C. Byrne
Genetics Institute
Cambridge, Massachusetts

Deborah E. Cabin
Johns Hopkins University School of Medicine
Baltimore, Maryland

Samuel S. Chong
Georgetown University Medical Center
Washington, D.C.

Michael Christiansen
Andersen Statens Serum Institut
Copenhagen, Denmark

Deanna Church
National Center for Biotechnology Information, NIH
Bethesda, Maryland

Chris D. Clark
Stanford University School of Medicine
Stanford, California

Richard G.H. Cotton
Mutation Research Centre
Fitzroy, Australia

Sandra L. Dabora
Brigham and Women's Hospital
Boston, Massachusetts

Paola Dal Cin
Brigham and Women's Hospital
Boston, Massachusetts

Muriel T. Davisson
The Jackson Library
Bar Harbor, Maine

Pieter J. de Jong
Roswell Park Cancer Institute
Buffalo, New York

Claire Delahunty
University of Washington School of Medicine
Seattle, Washington

Daniel B. Demers
Fairfax Identity Laboratories
Fairfax, Virginia

Johan T. den Dunnen
Leiden University
Leiden, The Netherlands

Sandy DeVries
University of California at San Francisco
San Francisco, California

Christine M. Distèche
University of Washington School of Medicine
Seattle, Washington

Carl Dobkin
Institute for Basic Research in Developmental Disabilities
Staten Island, New York

Norman A. Doggett
Los Alamos National Laboratory
Los Alamos, New Mexico

Timothy A. Donlon
Kapiolani Medical Center
Honolulu, Hawaii

Dongsheng Duan
University of Iowa
Iowa City, Iowa

John F. Engelhardt
University of Iowa
Iowa City, Iowa

Warren J. Ewens
University of Pennsylvania
Philadelphia, Pennsylvania

Lindsay Farrer
Boston University and Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

David J. Fink
University of Pittsburgh School of Medicine and VA Medical Center
Pittsburgh, Pennsylvania

Maximillian T. Foulettie
Genetics Institute
Cambridge, Massachusetts

Edward A. Fox
Brigham and Women's Hospital
Boston, Massachusetts

Cornel Fraefel
Institute of Virology
University of Zurich
Zurich, Switzerland

Eirik Frengen
The Biotechnology Centre of Oslo
University of Oslo
Oslo, Norway

Sean R. Gallagher
Motorola
Tempe, Arizona

Robert M. Gemmill
Institute for Cancer Research
Denver, Colorado

James German
New York Blood Center
New York, New York

Michelle Geschwend
Stanford University School of Medicine
Stanford, California

Longina M. Gibas
Jefferson Medical College
Philadelphia, Pennsylvania

John Gilbert
Duke University Medical Center
Durham, North Carolina

James M. Giron
Children's Research Institute
Washington, D.C.

Joseph C. Glorioso
University of Pittsburgh School of Medicine
Pittsburgh, Pennsylvania

William F. Goins
University of Pittsburgh School of Medicine
Pittsburgh, Pennsylvania

Robert E. Gore-Langton
Georgetown University Medical Center
Washington, D.C.

Joe W. Gray
University of California at San Francisco
San Francisco, California

Anoop Grewal
Silicon Genetics
Redwood City, California

Michelle Gschwend
Whitehead Institute for Genome Research
Cambridge, Massachusetts

Rebecca A. Haberman
University of North Carolina
Chapel Hill, North Carolina

Jeff Hall
Sequana Therapeutics
La Jolla, California

Barbara Handelin
Integrated Genetics
Framingham, Massachusetts

Elizabeth R. Hauser
Duke University Medical Center
Durham, North Carolina

Tong-Chuan He
The University of Chicago Medical Center
Chicago, Illinois

Ruth A. Heim
Genzyme Genetics
Westborough, Massachusetts

Henry H.Q. Heng
Unversity of Toronto and The Hospital for Sick Children
Toronto, Ontario

James G. Herman
The Johns Hopkins Oncology Center
Baltimore, Maryland

Eric P. Hoffman
Children's Research Institute
Washington, D.C.

Ourania Horaitis
Mutation Research Center
Fitzroy, Australia

Eivind Hovig
The Norwegian Radium Hospital
Oslo, Norway

Leaf Huang
University of Pittsburgh
Pittsburgh, Pennsylvania

Rene Hubert
University of Southern California
Los Angeles, California

Thomas J. Hudson
Whitehead Institute
Cambridge, Massachusetts

Mark R. Hughes
Georgetown University Medical Center
Washington, D.C.

Bradley T. Hyman
Harvard Medical School/ Massachusetts General Hospital
Charlestown, Massachusetts

Martin Ingelsson
Harvard Medical School/ Massachusetts General Hospital
Charlestown, Massachusetts

Panayiotis A. Ioannou
The Murdoch Institute for Research into Birth Defects
Royal Children's Hospital
Melbourne, Australia

Michael C. Irizarry
Harvard Medical School/ Massachusetts General Hospital
Charlestown, Massachusetts

Cynthia L. Jackson
Rhode Island Hospital & Brown University
Providence, Rhode Island

Laird Jackson
Jefferson Medical College
Philadelphia, Pennsylvania

John Jarcho
Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Erica Justice-Higgins
Massachusetts General Hospital
Charlestown, Massachusetts

Norman Kaplan
National Institute of Environmental Health Sciences
Research Triangle Park, North Carolina

Charles M. Kelly
Fairfax Identity Laboratories
Fairfax, Virginia

Jae Bum Kim
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Joan H.M. Knoll
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Sakari Knuutila
University of Helsinki
Helsinki, Finland

Donald B. Kohn
Children's Hospital of Los Angeles
Los Angeles, California

Robert G. Korneluk
Children's Hospital of Eastern Ontario
Ottawa, Canada

Karen Kozarsky
SmithKline Beecham Pharmaceuticals
King of Prussia, Pennsylvania

David Krisky
University of Pittsburgh School of Medicine
Pittsburgh, Pennsylvania

Gabriele Kroner-Lux
University of North Carolina
Chapel Hill, North Carolina

Pui-Yan Kwok
Washington University
St. Louis, Missouri

Sam LaBrie
Genome Systems Inc.
St. Louis, Missouri

Bruce Lamb
Johns Hopkins University School of Medicine
Baltimore, Maryland

Peter Lambert
Silicon Genetics
Redwood City, California

Lars Allan Larsen
Andersen Statens Serum Institut
Copenhagen, Denmark

Charles Lee
Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Esther P. Leeflang
University of Southern California
Los Angeles, California

Song Li
University of Pittsburgh
Pittsburgh, Pennsylvania

Peter Lichter
Deutsches Krebsforschungszentrum
Heidelberg, Germany

Sigbjorn Lien
Agricultural University of Norway
Aas, Norway

Stephen Little
Cellmark Diagnostics
Cheshire, United Kingdom

Janina Longtine
Brigham and Women's Hospital
Boston, Massachusetts

Karol Mackey
Molecular Research
Cincinnati, Ohio

Thomas L. Madden
National Center for Biotechnology Information, NIH
Bethesda, Maryland

Mani Mahadevan
Children's Hospital of Eastern Ontario
Ottawa, Canada

Peggy Marconi
University of Pittsburgh School of Medicine
Pittsburgh, Pennsylvania

Eden R. Martin
Duke University Medical Center
Durham, North Carolina

Hajime Matsukaki
Affymetrix
Santa Clara, California

Linda McAllister
Affymetrix
Santa Clara, California

John McPherson
Washington University School of Medicine
St. Louis, Missouri

Mark A. Micale
Case Western Reserve University and University Hospitals
Cleveland, Ohio

A. Dusty Miller
Fred Hutchinson Cancer Research Center
Seattle, Washington

Patricia Minehart Miron
Harvard Medical School and Brigham and Women's Hospital
Boston, Massachussetts

Jason H. Moore
Vanderbilt University Medical School
Nashville, Tennessee

Juliane Murphy
National Human Genome Research Institute, NIH
Bethesda, Maryland

Elizabeth G. Nabel
National Heart, Lung, and Blood Institute, NIH
Bethesda, Maryland

Gary J. Nabel
University of Michigan Medical Center
Ann Arbor, Michigan

Elizabeth Nanthakumar
Sequana Therapeutics
La Jolla, California

Nichole M. Napolitano
Genzyme Genetics
Westborough, Massachusetts

Deborah A. Nickerson
University of Washington School of Medicine
Seattle, Washington

Sarah L. Nolin
Institute for Basic Research in Developmental Disabilities
Staten Island, New York

Jan A. Nolta
Children's Hospital of Los Angeles
Los Angeles, California

Nassim Nouri
Affymetrix
Santa Clara, California

Kazutoyo Osoegawa
Roswell Park Cancer Institute
Buffalo, New York

B.F. Francis Ouellette
Centre for Molecular Medicine and Therapeutics
University of British Columbia
Vancouver, Canada

Irma Parra
Cancer Therapy and Research Center
San Antonio, Texas

Nila Patil
Affymetrix
Santa Clara, California

Mary C. Phelan
Thompson Children's Hospital
Chattanooga, Tennessee

Daniel Pinkel
University of California at San Francisco
San Francisco, California

Kim D. Pruitt
National Center for Biotechnology Information, NIH
Bethesda, Maryland

Ramesh Ramakrishnan
Virusys Corporation
North Berwick, Maine

Koustubh Ranade
Bristol-Myers Squibb
Princeton, New Jersey

Thomas A. Rando
Stanford University School of Medicine
Stanford, California

Rino Rappuoli
Chiron Corporation
Emeryville, California

Roger H. Reeves
Johns Hopkins University School of Medicine
Baltimore, Maryland

Willem Rens
University of Cambridge
Cambridge, United Kingdom

Carol Reynolds
Brigham and Women's Hospital
Boston, Massachusetts

Elizabeth M. Rohlfs
Genzyme Genetics
Westborough, Massachusetts

Mark T. Ross
The Sanger Centre
Cambridge, United Kingdom

Thomas Ryder
Affymetrix
Santa Clara, California

Richard Jude Samulski
University of North Carolina
Chapel Hill, North Carolina

Hong San
National Heart, Lung, and Blood Institute, NIH
Bethesda, Maryland

Karin Schmitt
University of Southern California
Los Angeles, California

Deborah E. Schofield
Children's Hospital and Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Rhona R. Schreck
Cedars-Sinai Medical Center
Los Angeles, California

Stuart Schwartz
Case Western Reserve University and University Hospitals
Cleveland, Ohio

Val Sheffield
University of Iowa
Iowa City, Iowa

Yongah Shin
Harvard Medical School/ Massachusetts General Hospital
Charlestown, Massachusetts

John M. Shoffner
Scottish-Rite Children's Medical Center
Atlanta, Georgia

Anthony P. Shuber
Integrated Genetics
Framingham, Massachusetts

Jeffrey Sklar
Brigham and Women's Hospital
Boston, Massachusetts

Paal Skytt
Andersen Statens Serum Institut
Copenhagen, Denmark

Barton E. Slatko
New England Biolabs
Beverly, Massachusetts

Birgitte Smith-Sorensen
The Norwegian Radium Hospital
Olso, Norway

Amanda C. Sozer
Fairfax Identity Laboratories
Fairfax, Virginia

Marcy C. Speer
Duke University Medical Center
Durham, North Carolina

Richard S. Spielman
University of Pennsylvania
Philadelphia, Pennsylvania

Matthew L. Springer
Stanford University School of Medicine
Stanford, California

Jordan Stockton
Silicon Genetics
Redwood City, California

William M. Strauss
Beth Israel Hospital/Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Kevin Struhl
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Damir Sudar
Lawrence Berkeley National Laboratory
Berkeley, California

Linda C. Surh
Children's Hospital of Eastern Ontario
Ottawa, Canada

Stanley Tabor
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Ludwig Thierfelder
Max-Delbruck-Centrum fur Molekulare Medizin
Berlin, Germany

Melissa M. Thouin
Children's Research Institute
Washington, D.C.

Jeff P. Tomkins
Clemson University Genomics Institute
Clemson, South Carolina

Didier Trono
University of Geneva
Geneva, Switzerland

Lap-Chee Tsui
University of Toronto and The Hospital for Sick Children
Toronto, Ontario

Jeffrey B. Ulmer
Chiron Corporation
Emeryville, California

Jeffrey Vance
Duke University Medical Center
Durham, North Carolina

Rolf Vossen
Leiden University Medical Center
Leiden, The Netherlands

Jens Vuust
Andersen Statens Serum Institut
Copenhagen, Denmark

Frederic M. Waldman
University of California at San Francisco
San Francisco, California

Douglas C. Wallace
Emory University School of Medicine
Atlanta, Georgia

Dorothy Warburton
Columbia University
New York, New York

William Warren
Institute for Cancer Research
Surrey, United Kingdom

Jonathan C. Wasson
Washington University School of Medicine
St. Louis, Missouri

Hugh C. Watkins
University of Oxford
Oxford, United Kingdom

Daniel E. Weeks
University of Pittsburgh
Pittsburgh, Pennsylvania

Jane M. Weisemann
National Center for Biotechnology Information, NIH
Bethesda, Maryland

Maryann Z. Whitley
Genetics Institute
Cambridge, Massachusetts

Mark Whitmore
University of Pittsburgh
Pittsburgh, Pennsylvania

Bradford Windle
The Cancer Therapy and Research Center
San Antonio, Texas

Rod A. Wing
Clemson University Genomics Institute
Clemson, South Carolina

Darren Wolfe
University of Pittsburgh School of Medicine
Pittsburgh, Pennsylvania

Tyra G. Wolfsberg
National Center for Biotechnology Information, NIH
Bethesda, Maryland

Fengtang Yang
University of Cambridge
Cambridge, United Kingdom

Jiing-Kuan Yee
City of Hope National Medical Center
Duarte, California

Lin Zhang
University of Southern California
Los Angeles, California

Yulong Zhang
University of Iowa
Iowa City, Iowa

Romain Zufferey
University of Geneva
Geneva, Switzerland

目 录

第1章 基因定位

研究某一性状基因的首要目标就是确定其突变、变异或多态性与某一特定疾病表型产生的因果关系，并描绘其遗传特征。图1.0.1为对性状基因研究的普遍策略，各步骤间呈现线性的和暂时的关系，且稍后的步骤开始时前一步并不一定已经结束。例如，在基因分型（第6步）和数据分析（第7步）后往往会继续样本的采集以加大样本量（第5步）。其一，在最初的家系调查中未知或未能获得其后追加的家系成员样本。其二，具有遗传异质性，通过精细定位和基因克隆积极寻找第一个基因位点，同时可收集更多的家系进行基因组扫描以寻求第二个位点。其三，在复杂性状的研究中，在进行基因组扫描的同时，往往需要第二套数据来检测最初感兴趣的区间。

在对DNA样本进行基因分型后，出现以下状况还需再采集某一个体成员的样本：①DNA样本被贴错标签（当至少有一个遗传标记明显地不遵循孟德尔遗传规律时可发现该错误）。②有迹象表明为错误的亲子关系，需进一步证实。③DNA样本遗失或用完。④某一个体发生了非常重要的（关键性的）重组事件，有待于进一步证实。

重要概念

孟德尔遗传

孟德尔第一定律——独立分配定律认为基因成对出现，在配子形成时，这一对基因分离进入不同的配子。孟德尔第二定律——自由组合定律认为不同对的基因是相互独立的，在配子中随机组合。由于孟德尔研究的大多数性状刚好都由一对等位基因控制，人类由于单个基因的突变而引起的疾病，其遗传方式通常符合孟德尔定律。但有时也会出现违背孟德尔第一定律从而导致染色体数目异常的情况（如单体的Turner综合征或三体的Down综合征）。对孟德尔第二定律的违背将引起遗传连锁（例如，基因组中的两个位点共分离的可能性大于随机分离的可能性）。

表现型与基因型

表现型是对性状的描述。例如，临床症状、定量测量、实验室检验或治疗结果。基因型是对DNA水平的描述，也就是某一特定位点的等位基因。

单一性状与复杂性状

任何由于单个基因的突变而引起的性状都被认为是符合孟德尔定律的。而某些疾病的形成是受多个作用一致的寡基因或微效基因的影响。多因子遗传则是对寡基因遗传或微效基因遗传的延伸。此外，非遗传因素（环境因素）也在其中发挥作用。寡基因性状、微效基因性状和多因子性状合称为复杂性状。

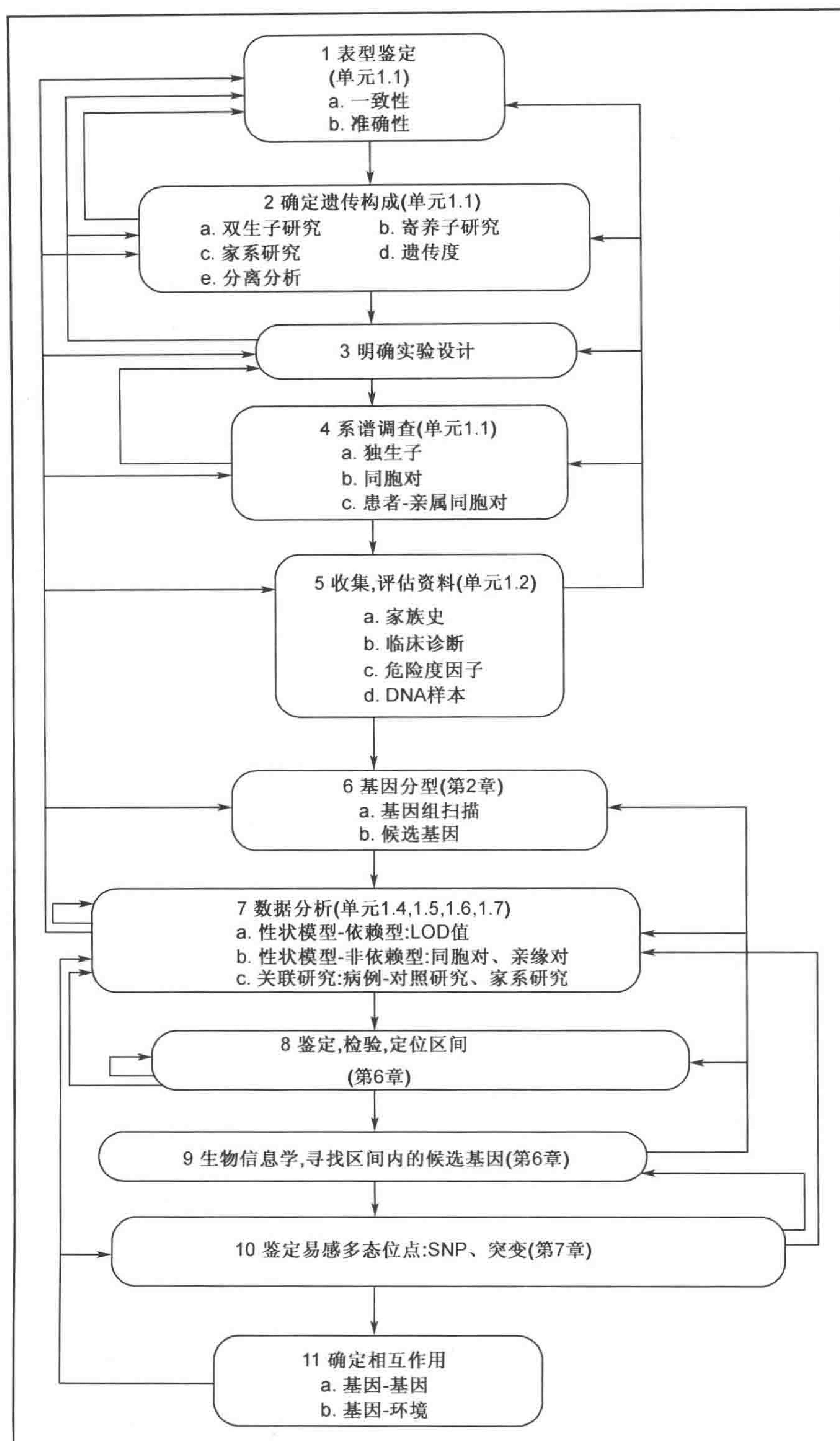


图 1.0.1　定位克隆流程图。

多态性

在同一位点处至少存在两种等位基因，且在人群中的出现频率均≥0.01，则其为多态。若任一等位基因在人群中的出现频率<0.01，则其为变异。

连锁分析与等位基因关联分析

前一种方法是利用连锁原理研究特定标记位点与疾病性状的关系，以计算该位点在家系中是否与疾病产生共分离单元1.4和单元1.5。后一种方法则通过某一基因位点的等位基因的出现频率来寻找与该疾病性状相关的基因（单元1.7）。

参考文献：Haines and Pericak-Vance，1998；Ott，1999

编者：Jonathan L. Haines

单元1.1　连锁研究所需临床和流行病学资料的收集

对某一DNA标记与某一疾病性状相关遗传位点之间的连锁关系的准确鉴定，必须基于该致病基因的存在以及对该特定疾病受累个体与未受累个体的正确区分。因此，以下临床和流行病学资料是必需的：①判断疾病是否由遗传因素控制，假如是的话，进一步确定其遗传方式；②选择合适的家系进行连锁研究；③考虑到遗传异质性的存在，可用疾病表型的亚型来评定；④用内在表型检验连锁或关联；⑤找出疾病基因型与表型的相关性；⑥如果由于外显不全或表现度差异导致表型隐藏，需推出家系中携带有某一特定基因型因而有患病风险者产生一定表型可能性的数学函数。本单元将就遗传影响的形成和连锁资料的收集进行相关的探讨。

遗传影响的可靠证据

要将遗传性疾病区别于那些虽具遗传性但不通过种系（即体细胞组织发生的突变）传递给下一代的疾病是非常困难的，并且需要大量的患者样本及专门的分析方法。有关这些分析的资料可从文献中获得，不过还需特别注意这些病例是否经准确诊断。有时可从以往的遗传分析记录中找到被研究性状的遗传方式。当缺乏可靠的出版物信息时，可用以下分析方法来确定其遗传方式。

双生子研究

该方法的依据在于，单卵双生儿（MZ）具有相同的遗传基础，而双卵双生儿（DZ）则一般只共享一半的基因。如果一对双生儿同时受累于某一疾病，则认为他们具有患病一致性。通过比较单卵双生儿（MZ）与双卵双生儿（DZ）的患病一致性，可得知遗传因素在其发病中所起的作用。如果同卵双生儿的同病率为100%而异卵双生儿的同病率为25%～50%，则可认为该疾病是在严格的遗传控制下的，可能是隐性遗传的单基因病（同病率约为25%）或显性遗传的单基因病（同病率约为50%）。在遗传因素起主导作用的疾病中，同卵双生儿的同病率将远大于异卵双生儿的同病率，并且分开培

养或一起培养的同卵双生儿其同病率是相同的，当同卵双生儿的同病率低或同卵双生儿、异卵双生儿同病率相同时，都提示环境因素在发病中起主导作用。双生子研究生物学上的局限包括产前因素以及双生儿受一致环境因素影响的倾向。另一个很大的局限在于双生子研究不能明确地判断遗传方式。

寄养子研究

对某一种遗传性状进行寄养子研究的依据在于，患者生物学上的亲属（父母、兄弟姐妹或者子女）的患病风险肯定高于其生活在同一个家庭里无血缘关系的亲属。这是为了判断环境因素对遗传性状发生的贡献大小所设计的对照，因为被收养者通常与有收养关系的亲属而不是生物学上的亲属共有相同的环境因素。寄养子研究的基本方法就是比较寄养子与亲生父母、养父母、寄养关系的亲属，以及由其他养父母养育的生物学上的亲属之间特点上的区别。根据不同的具体情况可有几种不同的对照设计。当寄养子就是先证者（在系谱调查时，因最先被发现具有某种遗传性状而被用来作为指示病例的个体），可比较受累寄养子与未受累寄养子中生物学上的亲属与无血缘关系亲属患病风险的差别。另一种情况是，当父母就是先证者时，可比较受累父母与未受累父母的寄养子女的发病率。最后，还可通过交换养育的方法，比较亲生父母正常但养父母受累的寄养子与亲生父母受累但养父母正常的寄养子的患病风险。

但寄养子研究还不是最理想的方法，这是因为：①很难获得足够量的样本，尤其是在农村地区无法得到有关领养的记录；②由于领养机构常常争取让寄养子与寄养家庭的社会经济背景相匹配，所以存在寄养关系的与生物学上的亲属的生活环境实质上不会有什么区别。此外，最终结果还需与通过寄养子对照组获得的结果进行比较，毕竟寄养子和他们的家庭并不能代表一般人群。但如果寄养子一出生就未离开他们的亲生父母则有可能混淆环境的影响。

复发风险

量度疾病遗传效应的另一种方法是计算复发风险。可通过比较现先证者（他们自己也受累于该性状）亲属与对照个体亲属表现该性状的比率来估计两种性状的家庭聚集倾向。如果在先证者亲属中发病率明显偏高，则可认为该性状在家系中聚集。但这种聚集也可能只是因为生活在一起的家庭成员共有类似的环境而并不是因为遗传因素。要确认遗传因素的参与，还需做其他的比较，常见的复发风险模式尤为重要。λR 就是指不同亲缘关系 R 亲属（如同胞、父母或子女）患病的再发危险除以人群患病率（即$\lambda R=kR/k$，kR 是不同亲缘关系 R 亲属患病的再发危险，k 是人群患病率），不同级别亲缘关系 R 的作用之一就是（$\lambda R-1$）的值可以预示可能的遗传模式。例如，如果性状由单个基因（有任意数目的等位基因）决定，当呈直线发展的亲缘关系每疏远一级，（$\lambda R-1$）的值就减少至原值的 1/2。亲-子关系定为一级亲缘关系。当性状由两个互不连锁的基因位点决定，如果位点的效应是倍乘的，则（$\lambda R-1$）的值下降得非常迅速，但如果效应是倍加的，则和单个基因位点表现一样。

遗传度

遗传度（h^2）估算是量度性状遗传效应的另一种有效方法。要确定遗传度，首先要把性状的全部表型变异（σ_T^2）分为遗传部分（σ_G^2）和非遗传部分（σ_E^2）。遗传变异又可进一步分为主效基因和遗传背景（多基因）两部分。遗传度定义为由多个基因累积效应造成的表型变异占全部变异的百分比，也就是多基因的那部分（σ_A^2）。h^2值越大表明遗传因素在疾病发生中的贡献越大。由于遗传度量度的是多个微效基因的遗传效应，因此只有当没有主效基因在疾病发生中起作用时，遗传度的估算才有意义。关于遗传模式，遗传度估算在假定不存在遗传异质性的情况下进行。特别是当数据来源于同胞，由于其共享了环境因素，遗传度的估算可能会有所膨胀。为了避免这一偏差，应该从其他的比较组（包括父母、子女和更远的相关个体）获得数据。

分离分析

一个更为直接的办法是将家系中受累者观察到的数目与预期的数目进行比较，并假定一个特定的遗传模式。由单基因控制的性状将会在家系中分离，并且表型比应与孟德尔比一致。然而，进行这类研究必须建立在家系中至少有一名受累成员的基础之上，所以对家系的评估校正尤为重要（单元 1.2）。例如，家系中的一个孩子在临床上被确诊患有纤维囊泡症，要评估他在家系中的分布，由于那些碰巧没有受累者的家系会被排除在样本之外（即只有那些已经临床诊断有一名肯定的受累者的家系才能进入样本），因此分离比（即子女中受累的比例）将远大于预期的 1/4。此外，在否定遗传假设之前检查预期比例偏差的大小与类型也是很重要的。除了临床诊断错误，还有其他的因素，诸如，延迟的发病年龄、可变的表现度和外显不全都会导致预期发病率的偏差。

用来计算分离比的方法依赖于系谱调查法。复杂的分离分析是采用的最大似然估计法。这个方法考虑到了遗传模型所涉及的几个因素之间的关联：显性度、外显率、基因频率、确诊率，以及疾病等位基因的孟德尔遗传模式。计算似然值（也就是数学估计某一家系资料是否符合某一种特定的遗传传递模式），并与同一家系资料在假定为另一种遗传传递模式情下计算出的似然值做比较。这样，可以确定疾病是否有一个主效基因位点，如果的确有，那么就计算连锁分析所需的模型参数：基因频率、遗传模式、外显率和突变率。已有不少用于分离分析的程序和软件包被开发，如 PAP 和 Mendel。

通过分离分析来研究疾病的遗传模式，必须严格按照基本操作手册上的方法获得一组家庭准确的表型和家系资料。为了准确地校正偏差，用来鉴定家系的诊断标准必须统一。因为有阳性家族史或明显的传递模式而被确定的家系不能被采用。分析中还需考虑一般人群中的发病率以及性别和年龄依赖性。研究所能获得的家系规模越大，则样本中所需的家系数目越小。如果疾病在一般人群中也较为普遍或存在可变的表现度或外显不全，则需采集更多的家系样本。通常至少需要 25～50 个核心家庭用来确定遗传模式。至于复杂性状（如酒精中毒），则实际所需的数目会超过几百。如果性状普遍存在（如灰发）或家庭单位（父母与孩子）统计不全，分离分析的结果不大可能有意义。

为连锁研究收集资料

策略方法

精确的表型评估（即诊断）通常有赖于医生的仔细检查，特别是那些外显不全（外显率即某一基因型显示某一预期表型的比率）和（或）有差异的表现度（即某一种遗传病患者间在临床表现和病情轻重程度上有所不同）。当疾病与身体异常无关（如行为失常和一些新陈代谢疾病），必须对包括实验室试验结果在内的多项数据进行评估后才能做出诊断。研究人员就诊断标准达成共识，如果可能，该标准可用来使数据标准化。整个连锁研究最好在双盲的情况下进行。做出临床诊断的医生不应知道遗传标记的数据，而进行 DNA 研究的工作人员则不应知道诊断结果。收集连锁研究所需的临床和流行病学资料的步骤如下（图 1.1.1）。

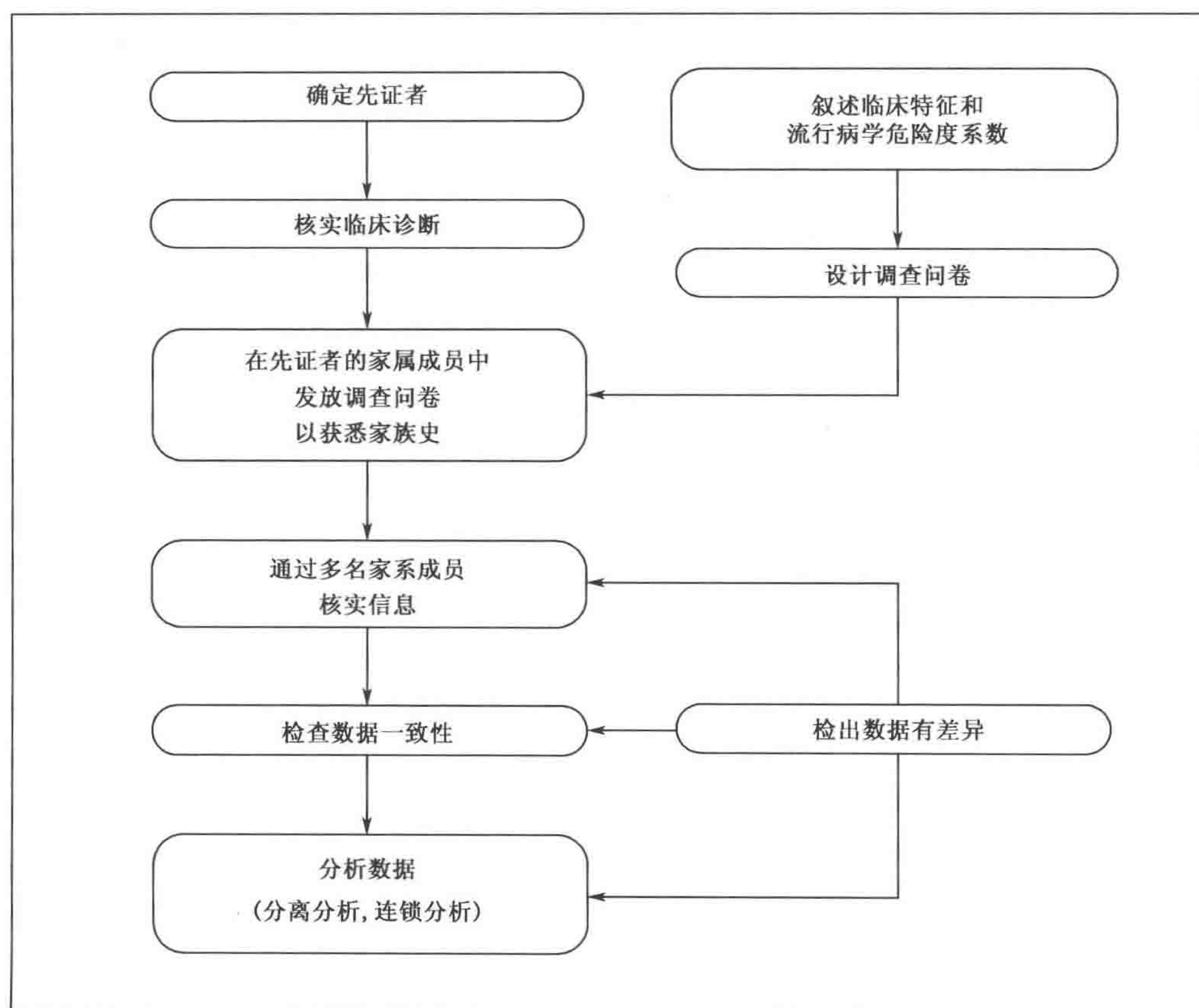


图 1.1.1　收集连锁研究所需临床、流行病学资料流程图。

1. 明确叙述研究性状的所有相关诊断信息，包括但仅限于：
   出现或缺乏的主要体征和症状；
   检查时的年龄；
   发病年龄和（或）疾病的特征；

Wilson氏病病历

Ⅰ.患者资料

患者姓名和（或）ID ________

家庭名和（或）ID ________

出生日期 ________ 死亡日期 ________

死亡原因 ________

发病年龄 ________ 诊断年龄 ________

Ⅱ.临床检查结果	是	否	不清楚	发病年龄
A. 肝				
肝硬化	____	____	____	____
黄疸	____	____	____	____
呕吐	____	____	____	____
抑郁	____	____	____	____
肝组织学检查	____	____	____	____
B.神经学表现	____	____	____	____
发音困难	____	____	____	____
不随意运动	____	____	____	____
假性延髓性麻痹	____	____	____	____
异常姿势	____	____	____	____
智力减退	____	____	____	____
精神病				
C.骨与关节问题	____	____	____	____
骨质疏松症	____	____	____	____
骨软化症	____	____	____	____
关节异常	____	____	____	____
韧带松弛				
D.肾脏	____	____	____	____
肾结石	____	____	____	____
氨基酸尿症	____	____	____	____
碱性尿	____	____	____	____
酸中毒	____	____	____	____
发育不全	____	____	____	____
E.凯-弗环				

F.其他(写下检查结果以及发病年龄)

____

____

图 1.1.2　患者病历表

Wilson氏病病历

III.化验结果

	已做化验(是/否)	结果	日期	治疗后化验(是/否)
血清 Cu 水平	______	______	______	______
血清 Ce 水平	______	______	______	______
肝酶(详细说明)	______	______	______	______

IV.治疗史

	给药(是/否)	第一次治疗日期或年龄	停止治疗日期或年龄
青霉胺	______	______	______
锌	______	______	______
曲恩汀	______	______	______
其他 ______	______	______	______

V.铜接触史

A. 饮用水流经铜管

	是	否	不清楚
生活	______	______	______
工作	______	______	______

B. 食用由铜器具盛放食物的频率

______ 一日3餐　　______ 一周1~6餐

______ 一日2餐　　______ 一月1~3餐

______ 一日1餐　　______ 每月<1餐

______ 不清楚

VI.备注

____

图 1.1.2　患者病历表（续）

描述的临床资料；
实验室测验结果，包括测试的日期；
流行病学危险度系数；
人口数据。
消除存在于大多数患者中不能被准确，完整解释的疑问。

2. 设计发放给患者个体的调查问卷。问卷应尽可能的简洁有效以争取患者的配合。设计与临床资料相对应的独特的标识符，用来追踪DNA标记在患者以及家系中的传递情况。运用表的格式（图1.1.2）、光学扫描格式（图1.1.3）或电子格式（e-form，见下）。
3. 确定先证者。例如，从患者登记处、临床人群、转诊中心、医院记录或流行病学调查。如果已确定遗传传递模式，要避免确认偏差（单元1.2）。
4. 研究者在对疾病非常了解的基础上就该疾病的诊断标准达成共识，并用该诊断标准核实先证者的临床诊断。必须小心处理，因为研究家系出现的假阳性结果会对连锁检出能力产生很大的影响，并会引起偏差从而导致研究者得出该疾病遗传模式中存在遗传异质性的错误结论。
5. 明确了对先证者的临床诊断后，发放调查问卷给家系成员获得研究性状的家族史。选择满足连锁研究需要的家系（单元1.2）。
6. 由临床医生或专家核实每一位参与了连锁研究的家系成员的诊断（即提供了血液样本者）。患者或家系被调查者自己提供的信息往往并不准确，不足以为信。
7. 当无法获得幼儿、无能力的个体、已故的人或其他亲属的信息时，如果可能，咨询多位可靠的信息提供者（如近亲）来核实有关资料。
8. 检查被调查者填写的问卷信息是否相互一致，接着校正矛盾处。

信息学

由于研究涉及多位受试者或大量的数据点，因此所有的研究数据应该用电子形式来收集以使数据的收集误差减至最低。由于误差常常来自于原始资料，当原始资料不易获得时，通过电子形式收集的数据的可靠性高于纸张形式。借由纸张形式，问题可能会被偶然地跳过，另外有些答案可能难以辨认。许多需要追踪、运输和拷贝的纸张形式已被电子形式所取代。借由纸张形式，数据往往至少要被抄写三次：最初的纸张表格、接着数据录入和再一次的数据确认。

借由电子表格，以及使用下拉菜单、区域登陆检查和数字范围检查能够预先确认数据。自动跳转区域能够与电子表格组合在一起，以便加快会话。通过已由安全传输密码技术（SSL）加密的网络浏览器，可从多个站点收集数据。微型计算机里安装的电子版的PDF格式使从不同的地点收集信息变得更为方便，例如，在研究参与者的家中。这些数据然后经由网络提交。电子格式如果有合理设计的数据库管理系统支持，可将在线表格进行数据转换，标准格式化后的数据可录入数据库，发报告，以及用各种统计分析程序进行处理。由于有关研究协调者们探查能力、参与能力以及各个研究项目的所有组成部分的情况的数据能被迅速地储存在在线中央资料库中，并能快速地反馈给他们。这样，资料收集过程中需要关注的问题可以很快被识别。图1.1.4示收集信息的模型和其

药物治疗史

中心: □□□	家庭 #: □□□□□	个体 #: □□□□

请列出过去使用过的药物	请列出现在正使用的药物和持续时间
立普妥 普雷马林	普拉固-两年

激素:	你曾经使用过...			现在正在使用?		如果"是",持续时间?	
口服HRT	□ 是	□ 否	□ 不清楚	□ 是	□ 否	年 □□	月 □□
口服避孕药	□ 是	□ 否	□ 不清楚	□ 是	□ 否	年 □□	月 □□
甲状腺剂	□ 是	□ 否	□ 不清楚	□ 是	□ 否	年 □□	月 □□
低葡萄糖药物治疗史:							
胰岛素	□ 是	□ 否	□ 不清楚	□ 是	□ 否	年 □□	月 □□
口服因子	□ 是	□ 否	□ 不清楚	□ 是	□ 否	年 □□	月 □□
低胆固醇药物治疗史:							
他汀类药物	□ 是	□ 否	□ 不清楚	□ 是	□ 否	年 □□	月 □□
Fibrate	□ 是	□ 否	□ 不清楚	□ 是	□ 否	年 □□	月 □□
树脂	□ 是	□ 否	□ 不清楚	□ 是	□ 否	年 □□	月 □□
高血压或心脏病药物治疗史:							
利尿剂	□ 是	□ 否	□ 不清楚	□ 是	□ 否	年 □□	月 □□
β-阻滞剂	□ 是	□ 否	□ 不清楚	□ 是	□ 否	年 □□	月 □□
其他	□ 是	□ 否	□ 不清楚	□ 是	□ 否	年 □□	月 □□
解热退热类药物使用史:							
非类固醇类因子 (如Advil、ibuprofen、Motrin、Alleve)	□ 是	□ 否	□ 不清楚	□ 是	□ 否	年 □□	月 □□
类固醇类因子 (如prednisone、cortisone)	□ 是	□ 否	□ 不清楚	□ 是	□ 否	年 □□	月 □□
减肥药	□ 是	□ 否	□ 不清楚	□ 是	□ 否	年 □□	月 □□

14351

图 1.1.3　光学扫描格式示例。空心小方格内印好的和实心小方格反应的字母数字信息会由光学扫描器来阅读。这些信息会被转变成数据流并通过电子的方式传递给中央数据库。一些光学扫描软件也可以阅读这些信息并存储为自由形态的印刷体字母格式的文本文件，但这都需要合理的数据库档案结构。在表格的四角有四个作为参考点的实心小方块，将被扫描的信息定位其中。每一张扫描表格可通过其上的一个有独特阴影图案的小方格来识别，见本表格右下角。

间的信息流。

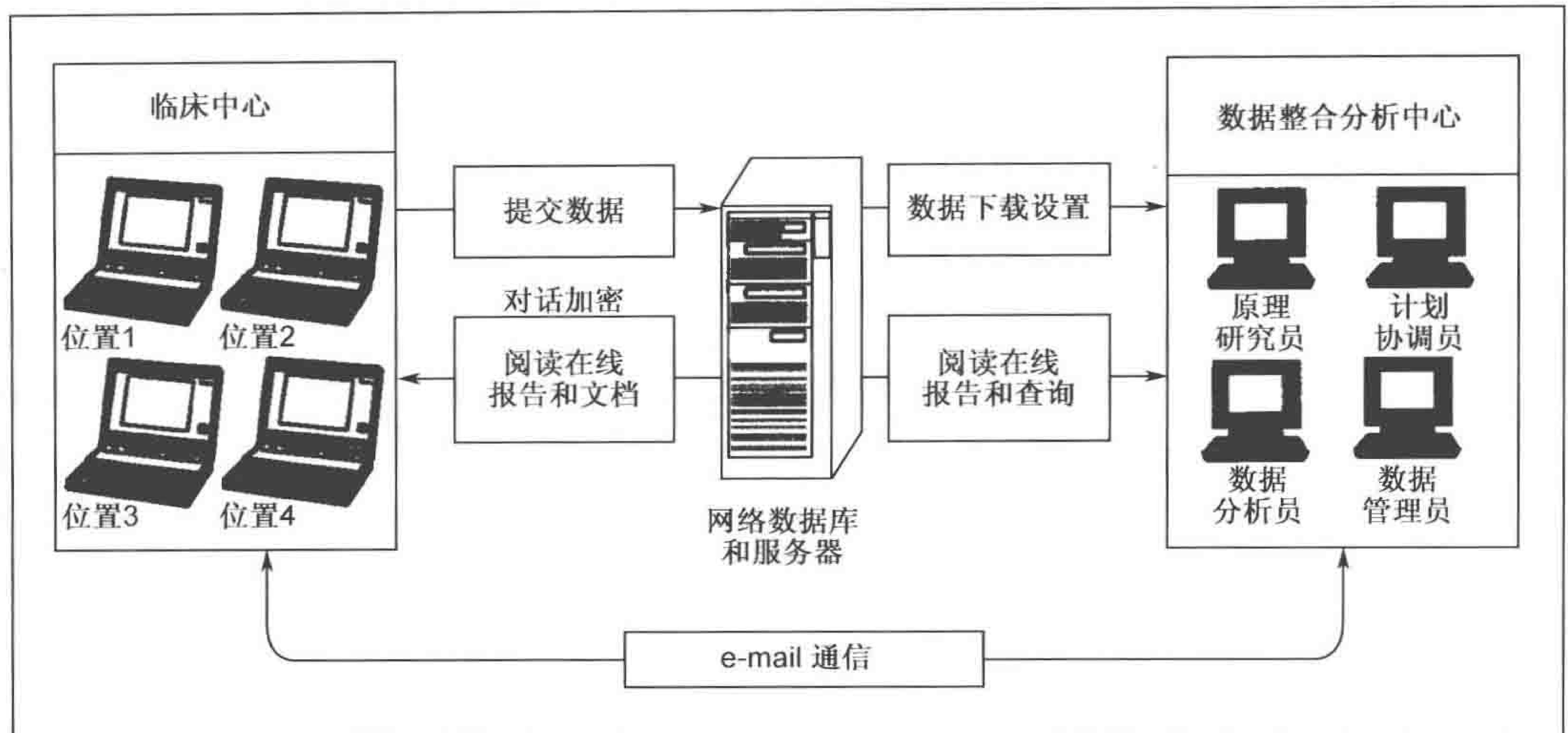


图 1.1.4　以电子数据管理系统设计来收集、传输、存储和检索信息的例子。调查表格的信息是采用笔记本计算机上安装的电子表格收集并进行错误检验和验证。数据通过电子的方式经由互联网提交给数据库服务器，并存档在永久数据库中。数据整合中心的工作人员对这些数据进一步核实，产生报告摘要，并分析其目的。这一设计也允许数据收集相关工作人员逐个核查数据并通过网络浏览器发报告。

参考文献：Khoury *et al.*，1993

编者：Lindsay Farrer

单元 1.2　家系选择和信息含量

策略方法

连锁分析是遗传病致病基因定位的有力工具，是基于观察遗传标记在一个家系或一组家系的传递过程中是否与疾病基因型产生共分离。连锁分析需计算出两个基因座位之间的重组频率，也就是遗传标记位点与致病基因。重组频率是两个不同基因座位上的等位基因发生重组产生亲代中所没有的新的组合的概率。两个位点之间的距离越远，在减数分裂中两个位点之间发生交换的可能性就越大。如果某一遗传标记和某一基因在同一条染色体上十分接近，那么来自于父亲或母亲等位基因的原有组合更有可能被一同遗传或产生共分离，这说明该位点连锁并且重组频率 $\theta<0.5$。如果位点间不连锁，那么两个位点上来自于父亲（或母亲）的等位基因将各自独立遗传，产生所有可能组合的可能性相等。不连锁情况下，$\theta=0.5$。

连锁分析有两种常用的方法。非参数分析法，包括患者-同胞对法和患者-亲属同胞对法，通过亲属个体对某个（些）标记位点等位基因的共享程度来判断两个位点连锁还是不连锁。基于如下假设，两个受累于同一疾病的亲属会共享致病基因附近的血缘一致

性等位基因，将高于等位基因随机分离的期望值。虽然在量度遗传效应（λ）强度时遗传模式可提供一定的参数，但非参数分析法并不需要考虑具体的遗传模式。传统的参数分析法需要给出有关遗传模式的所有信息，包括疾病的等位基因频率和外显率。这一方法中运用最为广泛的是传统 LOD 值法（单元 1.4），它在许多单基因病的定位中取得了巨大的成功。

选择进入连锁研究的家系以及家系资料的收集，其初步步骤见图 1.2.1。这些步骤适用于非参数研究，同样也适用于参数研究。

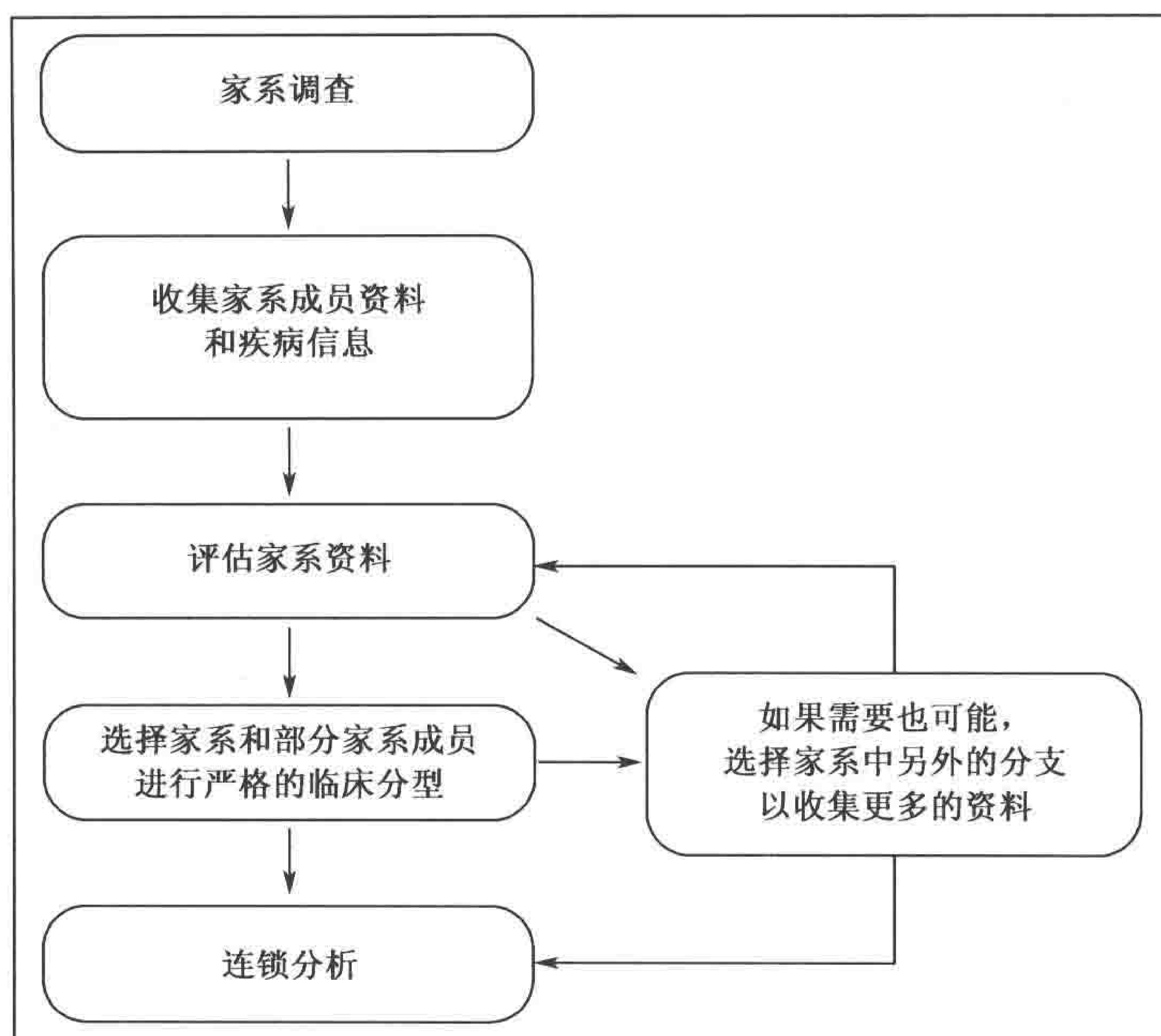


图 1.2.1　连锁研究初步流程图。

1. 如果计划进行连锁分析，则须根据仅由一个基因位点控制的表型（即疾病位点）鉴定（即确认）其在家系中的分离情况。家系鉴定通常是首先鉴定家系中最先被发现患有某种疾病的个体（先证者），然后收集有关疾病资料和家系成员个体间的相互关系（单元 1.1）。同样分离分析也需要进行严格的家系调查。
2. 通过计算某一指标，如指示每个家庭对全部能力所做可能贡献大小的预期 LOD 值，来判断是否连锁。在选择大量的遗传标记进行基因分型之前，须谨慎处理为进行连锁分析而收集的大量的家系资料。要想获得家系样本包含的潜在信息，最好是通过精心设计的模拟试验研究（见下）。
3. 根据包含的潜在信息，选择需要进行基因分型的家系和个体，即提取 DNA 样本和严格的临床诊断。每个家系中仅选择部分家庭成员而不是每一位成员针对感兴趣的遗传标记进行分型，可大大优化连锁的检出能力。不要机械地仅采用大家系，也不要随意地排除双线性的家系（见下）。
4. 如果需要也可能的话，选择家系中另外的分支以收集更多的样本资料。这一决定可能是依据非正式的家系扩充规则或模拟研究（见下）。但如果进行分离分析的话，则

需遵守比较正式的家系扩充规则。模拟研究被用来评估样本信息量的不同扩充所引起的效应的大小。

重要概念

收集家系的遗传信息需先回答以下问题：①给定一个感兴趣的定义明确的表型，可以采集到大的家系样本并且家系中有许多受累个体吗？②主要是同胞对或其他的亲属对吗？③家系中有一位最先被发现患有某种疾病的个体吗？④每种类型的家系可以收集到几个？如果经鉴定的家系，我只能选择其中一支进行研究，我该如何选择？如果我想扩充家系，我该研究哪一分支，最有可能观察到连锁？如同下面所讨论的，采集到了什么样的家系就决定了用哪一种分析方法。

系谱调查偏差

通常判断某一疾病是否是隐性遗传决定于出生患儿的概率是否是1/4，但仅选择至少有一名患儿的家系来收集数据，这一概率将远大于1/4，只是因为采样的过程中偏向于选择患儿。这些收集的家系并不能代表一般人群，因为没有包括那些没有患儿的家系。例如，某人试图确定遗传模式、估算外显率或绘制发病年龄曲线，如果采样（或系谱调查）中存在这样的偏向会导致其得出错误的结论。如果某人只对连锁分析感兴趣(即估算重组频率)，那么采样和系谱调查中存在的偏差就无关紧要，只要根据疾病位点的表型个体被明确是单独的。然而，如果希望通过仔细精确的分离分析明确疾病的遗传模式，那么系谱调查和采样的方法就必须明确以校正可能的偏差。

正确的系谱调查方案包括以下几个方面：①采集有一名患儿的核心家系；②采集亲代有一名患者的核心家系；③采集有几名患儿的核心家系。

依序抽样提供了扩充家系结构的规则，采用这一办法收集家系可校正抽样偏差。一个典型的依序抽样的程序是：①如果先证者（单元1.1）是受累者，收集先证者、配偶及先证者的一级血缘亲属的资料；②采集每一个新发病的个体，并采集这些个体的配偶以及所有的尚未收集资料的一级血缘亲属的样本；③重复第2步直至没有新的患者被发现。需要注意的是依序抽样需遵循严格的规则，新资料的收集必须建立在已有资料的基础之上。依照上述规则，只有通过一名患者相互联系的那部分家系成员须被采样，而由那些亲缘关系较远的受累者间接获得的资料则必须被舍弃。

一般的指导方针：①如果进行了家系调查和表型（由单个基因位点控制）鉴定，并根据表型采样，连锁结果不会出现偏差；②只有当抽样法是精确定义并被准确应用时，才有可能无偏差地确定遗传模式（通过分离分析）。

家系的信息含量

连锁研究中，研究者可能必须选择几个家系中的一部分做进一步的详细分析。为了有效地完成这些分析，研究者必须清楚地知道每一个特定的家系究竟包含了多少对连锁研究有用的信息。

染色体相位

假定某一已被分型的个体在同一条染色体上有两个紧密连锁的标记位点。如果该个体是个复合杂合子（第一个基因座上是 1/2，第二个基因座上是 A/B），那么这个人可以是一个 1 和一个 A 等位基因位于同一条染色体上或者是一个 1 和一个 B 等位基因位于同一条染色体上。换句话说，该个体的多位点基因分型可被写成 1A/2B 或 l B/2A。由于连锁分析是基于重组事件，因此知道这些“相位”哪个才是正确的非常重要，因为 1A/2B 的基因型会产生 1B 的配子，那么这个配子就是重组子。但如果同一个体是 lB/2A 的基因型，并产生 1B 的配子，那么这个配子是非重组子。如果可以推断出染色体的两个位点携带的是哪种等位基因型，则相位被视为是已知的。

相位信息可从两个来源获悉。首先，可由父母的基因型推出。这一方法的实例见图 1.2.2，此图示一个罕见的常染色体显性遗传病家系，伴完全外显。致病等位基因用“D”表示，正常等位基因用“d”表示。这个家系在一个标记位点被分型成了 4 种等位基因（1、2、3 和 4）。在这一实例中，可推出母亲（个体 3）的基因型是 D1/d3，因为等位基因 D 连同等位基因 1 都只可能来自于外祖父（个体 1），等位基因 d 和等位基因 2 则都只可能来自于外祖母（个体 2）。由于个体 3 是已知基因型的复合杂合子，所以可以很容易就推出个体 5 一定得到了来自于母亲的等位基因 d 和等位基因 1，而个体 6 则一定得到了来自于母亲的等位基因 D 和等位基因 1。因此，个体 5 得到的是来自于母亲的一个发生了重组的配子，个体 6 则得到了一个来自于母亲的未发生重组的配子。还需注意的是个体 4 在疾病位点是纯合的（d1/d4），因此无法提供有效的连锁信息。

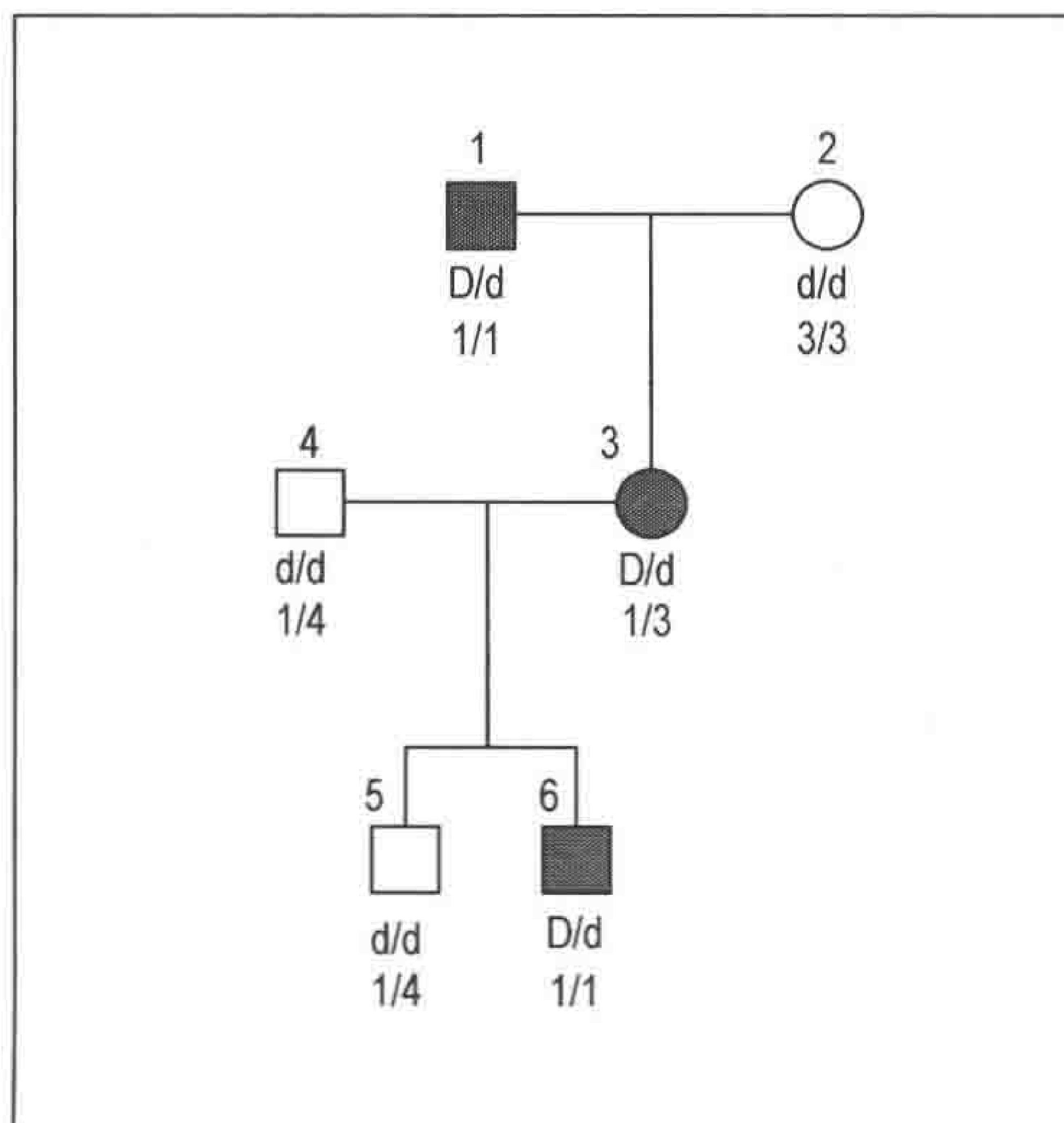


图 1.2.2　一个常染色体显性遗传病三代家系图。

其次，相位还可以直接由子代的基因型推出。图 1.2.3 所示另一个携带有相同标记位点的家系。如果假定该标记位点与疾病紧密连锁，那么这两个基因之间不大可能会发生重组，母亲的基因型极有可能是 D1/d3，因为她将 D1 单体型传给了她是患者的儿子以及 d3 单体型传给了她不是患者的儿子而没有发生重组。然而，由于母亲的双亲的基

因型未知，同时我们也无法获知该标记位点是否如假定的那样与疾病位点紧密连锁，因此关于母亲基因型的信息无法直接得出。换句话说，子代的基因型已知，并不能派出母亲任何可能的基因型，它只能改变它们的可能性。

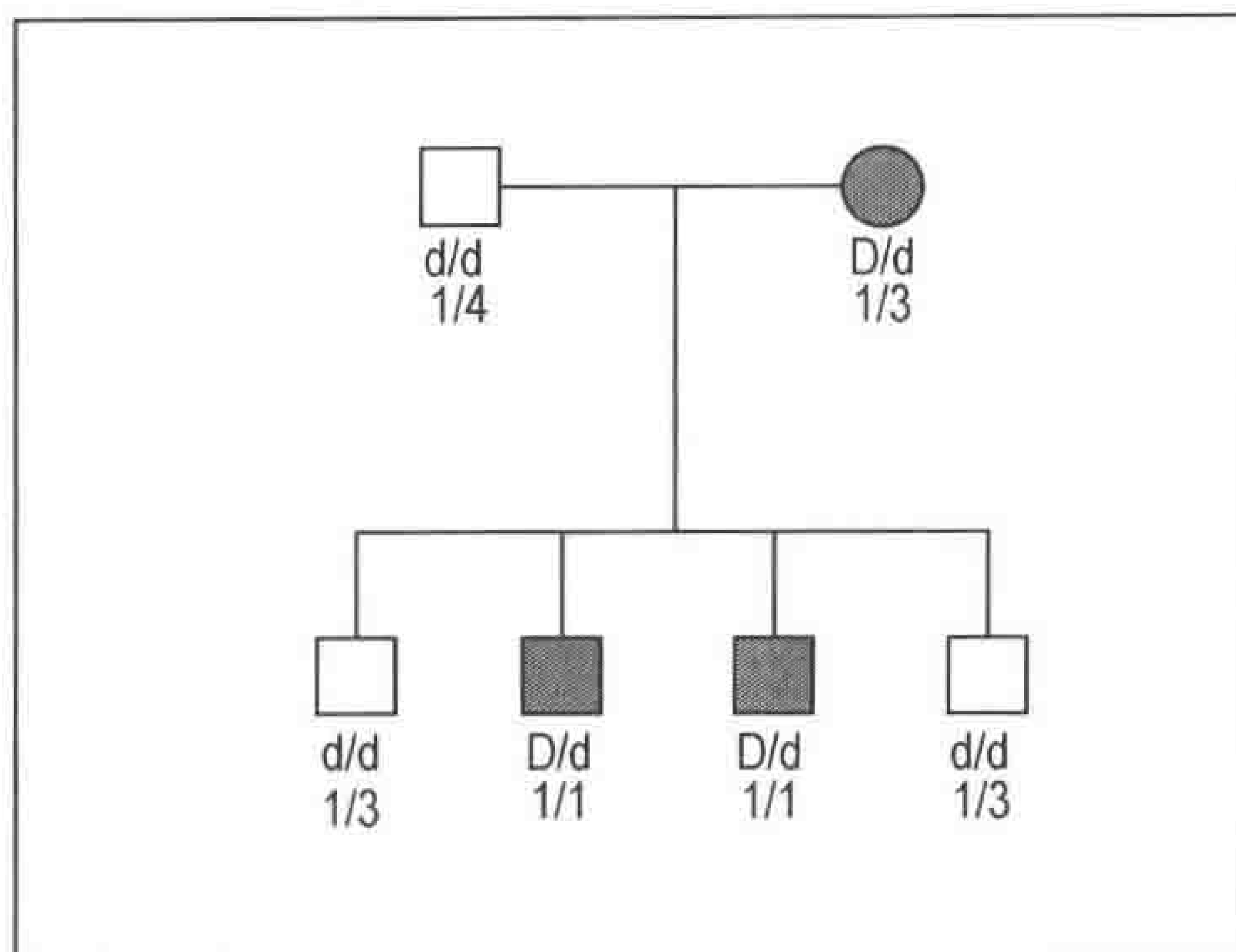


图 1.2.3 一个常染色体显性遗传病的核心家系图。

一个核心家庭包括非近亲结婚的双亲和一个孩子，核心家庭并不能提供连锁的有效信息（在假定连锁平衡的情况下；如下），因为单凭一个孩子并不足以推出父母的基因型。例如，在图 1.2.4 所示的家系中，如果父亲在疾病位点是杂合状态，那么并没有足够的信息来断定父亲是 D1/d4 或 D4/d1。因此，这类家庭总是给出一个为 0 的 LOD 值（单元 1.4），也就是不包含连锁的信息。但是，如果这样的家庭还包括有祖父母便可以提供有效的连锁信息，因为基因型可知。

一般的指导方针：那些染色体相位可被推出的个体可以提供更多的信息。关于连锁的信息主要来自于那些携带有已知基因型的复合杂合的个体。

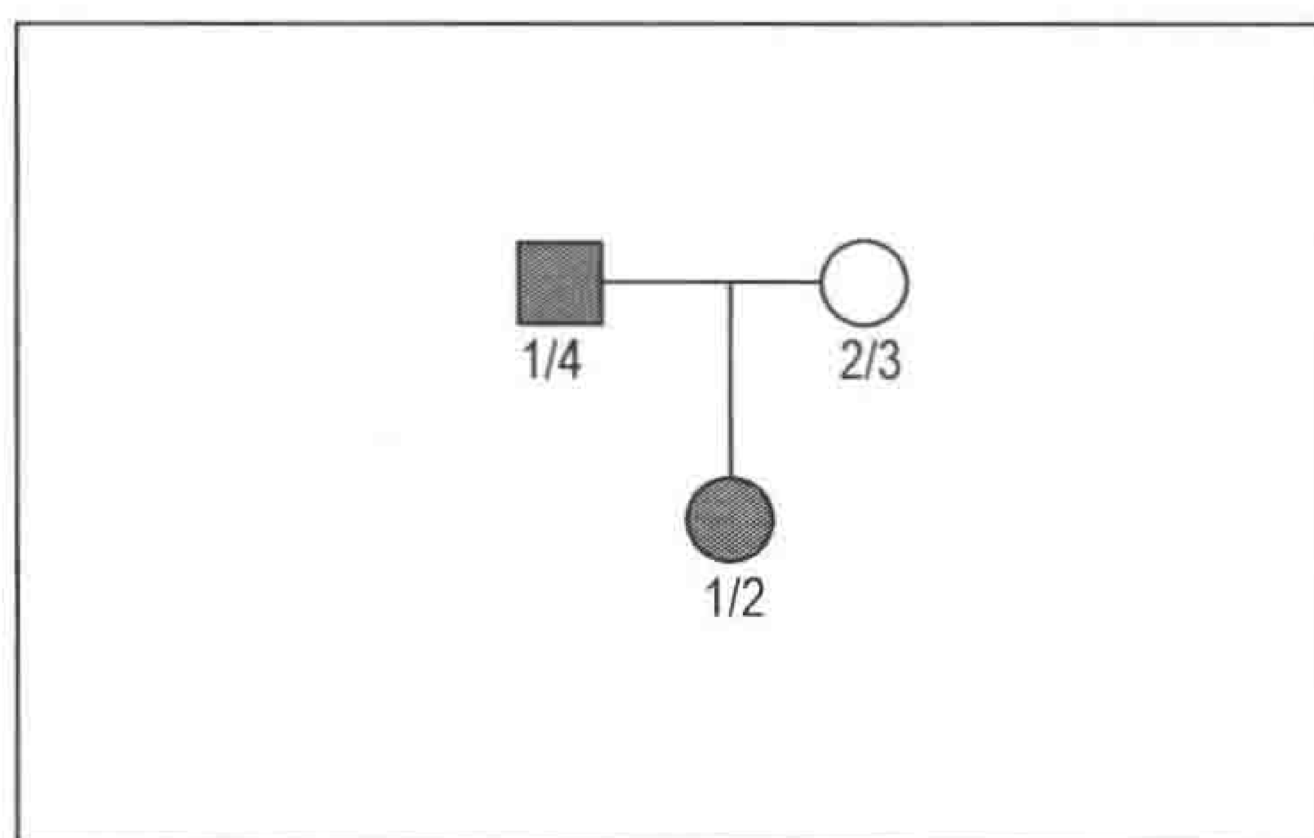


图 1.2.4 含有一个子代连锁信息的核心家庭。

追加的孩子的信息含量

某一家庭的信息含量可以通过预期 LOD 值来衡量（单元 1.4），这个家系每追加一个孩子其 LOD 值都会增加。在最理想的条件下，并假定疾病位点和标记位点之间没有发生重组，那么在一个罕见的常染色体显性遗传病家系中每一个追加孩子都值约 1/10 的显著 LOD 值（也就是，约 0.30 个 LOD 值单位）。而对于罕见的常染色体隐性遗传病，每一个追加的患儿值约 0.60 个 LOD 值单位，每一个追加的正常孩子则值约 0.13

个 LOD 值单位。

家系结构以及信息含量

同一个两代家系相比，家庭中所有成员都已被分型的一个三代家系往往包含更多的连锁信息。

核心家庭与大家系比较

一个大的多代家系应包含有更多的连锁信息，这是因为在多次减数分裂中，疾病会发生分离，并且染色体相位已知。此外，数代都有患者出现的大家系，其疾病性状更有可能以显性的方式在家系中分离。因此，连锁分析可以在显性的模式下进行，假设不会影响结果。通常大家系的遗传模式不需要进行分离分析就可以确定，而核心家庭的遗传模式则可以简单地通过分离分析得出。大家系可以代表一种独一无二的疾病遗传模式，并且对可能的误诊和基因分型错误更为敏感。此外，对于正在研究中的疾病，大家系并不能保证遗传同质性或单个主要基因位点的存在。

家系扩充

家系中某些没有发生疾病性状分离的部分，只能提供很少或不提供额外的连锁信息。由于患者的正常同胞或正常子女肯定遗传了正常单体型，因此他们可以有代表性地提供一些额外的信息。然而，这些正常个体提供信息量的多少依赖于几个因素，包括疾病的外显率和任何发病年龄函数。

双系家系和单系家系

如果同一疾病在家系的两侧都发生了分离，则这个家系被认为是双系的。换句话说，在双系家系中，单个疾病等位基因（或多个等位基因，因为疾病可由位于相同或不同位点的多个不同的等位基因所控制）一定曾经进入过该家系至少两次。而在单系家系中，疾病则只进入了一次。对精神疾病进行连锁研究时，常常会自动排除双系家系，这是因为在同一家系发生分离的两种具有不同遗传基础的疾病却有相似的表型。此外，关于染色体相位和致病基因的起源，双系家系被假定只能提供很少的信息。然而，模拟研究已经显示，如果双系性不是太广泛的话，那么信息损失就是因为双系性太小；虽然相位-未知核心家庭与相位-已知核心家庭相比，信息损失量更大。分离出了两种遗传基础不同但表型相同疾病的双系家系对平均最大 LOD 值几乎没有什么影响，也不大可能导致得出排除连锁的错误结论。先证者父母都是患者的极端双系家系也只能提供很少的连锁信息。

连锁平衡

认为存在两个基因位点，每个基因位点都有两个等位基因。如果第一个位点有等位基因 1 和 2，第二个位点有等位基因 A 和 B，那么两个位点就有四种可能的组合（或单体型）：1A、1B、2A 和 2B。如果根据个体的等位基因频率推测，单体型以预期频率出现，那么这两个位点呈连锁平衡。但是如果出现这种情况，如单体型 1B 出现频率高于

期望值，那么这两个位点呈连锁不平衡。连锁不平衡发生的原因可以是一个新发突变、不同群体混居、小群体随机抽样和特殊单体型的优势选择。因为特殊单体型的频率其实就是由该单体型携带的等位基因的频率简单推出的，所以大多数的连锁分析软件都假定连锁平衡存在。

确定样本含量和检验效能的模拟研究

模拟研究是一种用来了解连锁检验能力的特殊方法，有两个量需要估计。第一个是检验水准，也就是 α 水平或检验的显著性，它被定义为在无效假设下得出一个显著性检验统计量的概率，也就是疾病位点和标记位点不连锁。在某些情况下，可以根据理论因素确定检验水准。另一种估计检验水准的方法是，在疾病和遗传标记不连锁的条件下，对数据集的数千次重复进行模拟（也叫做无条件模拟）。这就相当于标记等位基因在家系中分离而不考虑个体的疾病状态。每一次重复都用连锁检测来分析，并计算检验统计量超过某一临界值的重复的比例。很显然，临界值的选择决定了检验水准。较低的临界值会得出较高的检验水准，也就是，更多的重复超过了临界值；而较高的临界值则会得出较低的检验水准，也就是，较少的重复超过了临界值。

第二个需要估计的量是研究效能。效能被定义为，规定疾病和遗传标记之间连锁的特定模式，在重复研究中，得出高于临界值检验结果的那部分所占的比例。确定效能需要规定疾病和遗传标记之间的关系模式（单元 1.5）。根据采用的分析类型，这一模式可能或多或少地被完全指定。确定效能也需要规定连锁检验的临界值，并且是在检验水准固定的前提下选择临界值，如 $\alpha=0.05$。再一点，对于确定无疑的病例，它可能从理论上确定效能。更多的时候是用模拟试验来研究效能。如同以前，对效能的估计，是根据疾病的模式和家庭成员的疾病表型通过模拟标记等位基因在家系中的传递（也就是有条件的模拟，因为这些标记是根据疾病模式和观察到的家庭成员疾病表型，然后有条件的模拟的）。在研究设计中，效能是一个特别重要的因素，因为它能够根据疾病的特定模式判断一个给定的样本量是否可能得出一个具有显著意义的结果。如果疾病模式正确且效能高，那么样本量能充分满足鉴定疾病位点的需要。如果疾病模式合理但效能低，就必须要考虑加大样本量，以确保该研究可得出一个结论的最大可能性。

参考文献：Davis and Weeks，1997；Elston *et al.*，1996；Martin *et al.*，2000；Ott，1999

编者：Elizabeth R. Hauser and Daniel E. Weeks

单元 1.3 单精子分型

单精子分型指的是分析个体雄配子的 DNA 序列。它可以检测单个个体的重组以及其他遗传现象。精子分型的一个优点体现在需要大样本量的遗传研究中，如一份精液样本中的精子数目对于任何研究目的来说都是取之不尽的。精子分型在以下几种特殊情况下可能非常有用，包括：在＜1～2cM 的距离内决定多态位点的物理顺序（假定无法获得可靠的物理图谱），当无法获得双亲的有关信息时确定单体型（“背景状态”），精细检查重组率显著增高或下降的可疑染色体区域，检查个体间的重组差异，估计种系突变频

率以及分析分离偏斜。

注意：包括 PCR 在内的实验需要极度的小心以避免污染。建议使用专供 PCR 用的屏蔽式移液器枪头和移液器。

基本方案 1　PCR 扩增单精子遗传标记

材料（标√的条目参见附录 2）

从琼脂糖薄膜分离的已裂解的精子（支持方案 1），或流式细胞计量术（支持方案 2），或 PEP 产物（支持方案 4）

√ 中和缓冲液

√ 10×扩增缓冲液（含钾离子）和 10×扩增缓冲液（不含钾离子）

√ 2mmol/L 4dNTP 混合液

100μmol/L 第一套引物（支持方案 3；－20℃保存）：正向和反向

5U/μl *Taq* DNA 聚合酶（Perkin-Elmer，Promega）

轻质液体石蜡油

100μmol/L 第二套引物（支持方案 3；－20℃保存）：半巢式或巢式（如果是半巢式，则第一套引物中的正向或反向引物这里也被用到，取决于巢式引物的位置）

96 孔 PCR 仪（如 PTC-200；MJ Research）和 96 孔板或离心管

注意：所有的试剂应用超纯水配制。

1a. 从琼脂糖薄膜分离的单个精子：准备第一轮 PCR 的试剂，每个 PCR 管或 96 孔板的每个孔已加有 5.0μl 裂解液，精子悬浮其中，再加入以下试剂：

5.0μl 中和缓冲液；

5.0μl 10×扩增缓冲液（不含钾离子）；

2.5μl 2mmol/L 4dNTP 混合液；

2.0μl 1pmol/μl 单向引物（由 100μmol/L 储存液稀释而来）；

0.1μl 5U/μl *Taq* DNA 聚合酶；

加水至总体积 50μl。

1b. 经流式细胞仪获得的已被裂解和中和的单精子：如 1a 描述的准备反应，但把中和缓冲液换成水。

1c. PEP（引物延伸预扩增）产物：每个 PCR 管或滴定板的每个孔依次加入各种 PCR 试剂，再加入 PEP 反应产物 2～5μl（或是其他实验经验值）。如 1a 中的步骤准备 PCR 试剂，但改用含有钾离子的 10×扩增缓冲液，并把中和缓冲液换成水。

2. 如果 PCR 仪没有配置加热盖，那么每个孔应覆盖一层轻质液体石蜡油，以防止蒸发。按以下方法进行第一轮 PCR 扩增（优化了的多重 PCR 可以同时扩增 16 个不同的位点，也就是 32 条引物）。

第一步：	3min	94℃	（变性）
1 个循环：	2min	55℃	（复性）
	1min	72℃	（延伸）

4个循环：	15s	95℃	（变性）
	1min	55℃	（复性）
	1min	72℃	（延伸）
35个循环：	15s	95℃	（变性）
	30s	55℃	（复性）
	30s	72℃	（延伸）
最后一步：	无限期	4℃	（保持）

3. 准备第二轮PCR扩增反应试剂：
   2.5μl 10×扩增缓冲液（含钾离子）
   2.0μl 2mmol/L 4dNTP 混合液
   1.0μl 10.0pmol/μl 单向第二轮引物（由100μmol/L储存液稀释而来）
   0.1μl 5U/μl *Taq* DNA 聚合酶
   加了第一轮PCR反应产物（1～2μl）后，用水调整总体积至25μl。
4. 取一新的96孔PCR板，每孔加足量的第二轮PCR反应试剂，保证总体积为25μl。每孔再加入1～2μl第一轮PCR反应产物。如果必要，每个孔覆盖一层轻质液体石蜡油。按以下方法进行第二轮PCR扩增（应根据特异性引物的不同组合调整复性温度/时间）。

第一步：	3min	94℃	（变性）
35个循环：	15s	95℃	（变性）
	30s	55℃	（复性）
	30s	72℃	（延伸）
最后一步：	无限期	4℃	（保持）

   如果需要，样品无限期4℃保存（直至分析完成）。
5. 用现成的通用方法确定SSLP或SNP标记等位基因状态（如非变性PAGE）。

支持方案1 从琼脂糖薄膜分离单个精子

材料（标√的条目参见附录2）

精液
0.5%（*m*/*V*）低熔点琼脂糖
√细胞裂解液
√中和缓冲液（可选的）
凝胶成样器和电泳仪（如Hoefer 200系列）
倒置相差显微镜100×物镜
Paragon 11号手术刀片（Maersk Medical）
PCR管
立体显微镜4.6×物镜
65℃水浴或热循环仪

注意： 工作应尽可能在层流通风橱内完成，以减少污染。应严格遵守标准无菌操作。

1. 将 2～10μl 精液（根据实际精子浓度）与 20ml 0.5%（*m/V*）低熔点琼脂糖混合。将 2ml 凝胶倒入一个 10cm×10cm 玻璃板中，轻轻移动玻璃板以使凝胶的厚度为 1～2mm。如果必需，优化精子浓度以提高挑选单精子的效率。
2. 琼脂糖凝胶置于 37℃、20min，直至完全凝固。
3. 将玻璃板放在倒置相差显微镜 100×物镜下。用 Paragon 11 号手术刀片切下一块含单个精子的琼脂糖凝胶，斜切角度与水平轴呈 30°～40°。选择靠近琼脂糖凝胶边缘的精子（这里的琼脂糖还未完全脱水），切下的胶块的直径 10 倍于精子。
4. 将胶块移入一已加有 5μl 细胞裂解液的 PCR 管中，PCR 管固定在立体显微镜 4.6×物镜下。在显微镜下观察以确定胶块完全浸没于裂解液中。

   确定 96 孔板中胶块的浸没情况比单个 PCR 管难得多。

5. PCR 管于 65℃温育 10～15min。裂解产物立即进行第一轮 PCR（基本方案 1），或加入 5μl 中和缓冲液，盖上管盖，－20℃保存备用。

支持方案 2　用流式细胞计量术分离已裂解了的单精子细胞

材料（标√的条目参见附录 2）

基因分型供者的精液
5μg/ml Hoechst 33342（一种 DNA 的特异荧光染料）
70%（*m/V*）蔗糖
携带 Hoechst 33342 的荧光微球（Flow Cytometry Standards）
10%（*V/V*）次氯酸钙（次氯酸钠；如 Clorox）
√细胞裂解液
√中和缓冲液
Biosonik Ⅲ超声波细胞打碎机 带 4-mm 探针（Brownwill Scientific）
相差和荧光显微镜
FACStar Plus 荧光活化细胞分选仪（Becton Dickinson）
灵活的 96 孔微量滴定板（如 Falcon）或 96 管体系（如 GeneAmp PCR System 9600、Perkin-Elmer Cetus）
与 96 孔微量滴定板或 96 管体系相容的 65℃水浴或热循环仪

注意： 所有的试剂应用超纯水配制。

注意： 工作应尽可能在层流通风橱内完成，以减少污染。应严格遵守标准无菌操作。

1. 将 100μl 基因分型供者的精液与 500μl 水混合于一 1.5ml 微量离心管中。室温下 883*g* 离心 1min 沉淀精子。弃上清，加 500μl 水，使精子重悬于水中。
2. 用带 4mm 探针的 Biosonik Ⅲ超声波细胞打碎机以最低强度处理细胞悬液（或其他仪器的其他强度），使精子去尾。
3. 室温下 883*g* 离心 1min 沉淀精子。弃上清，加 500μl 水，使精子重悬于水中。

4. 在相差显微镜下检查一小部分精子以确定完全去尾。如果必要，重复第2、3步。

   短尾的精子（也就是，尾部的长度是头部的1/4）没有问题。长尾的精子被认为会阻塞细胞分选仪的喷嘴。

5. 室温下883g离心1min沉淀精子。弃上清。沉淀重悬于100μl 5μg/ml Hoechst 33342中。37℃孵育1～24h。当精子样品很少或为了限制细菌繁殖带来的污染，可减少染色时间。
6. 室温下883g离心1min沉淀精子。弃上清，沉淀重悬于200μl水中。以和第2步相同的强度处理细胞悬液5s以减少凝集。
7. 加200μl 70%（m/V）蔗糖后立即分选（第10步），或－20℃保存1年（或更长）备用。
8. 用携带Hoechst 33342的荧光微球调整FACStar Plus荧光活化细胞分选仪，使荧光信号的强度达到最强。调整控流设置使每一分选液滴中只包含一个珠子的量。
9. 分选几排单荧光到显微镜的玻片上，通过荧光显微镜，检查分选可以使每一分选的液滴中仅包含一个珠子的量，确认仪器和控流设置的调整。如果不是，重新调整控流设置。
10. 用水或10%（V/V）的漂白剂和随后的水从仪器中冲洗珠子，直至没有荧光信号出现。保证漂白剂完全被清除。
11. 准备分选时，用水稀释部分染色的精子至100倍（或者调整流速使精子数量达到分选窗的标准也是约1个细胞/s）。将这些精子的样本加入，然后重设分选窗口，在水平轴上使用边缘散射点，在垂直轴上使用荧光信号，这样可以使主要的单精子部分在分选窗口中，而两个或多个的精子团则可以被排除。
12. 分选数排单精子到显微镜载玻片上。用荧光显微镜检查分选结果的确是在液滴中是单精子。分选过程中固定时间重复此确认步骤，使控流设置保持稳定，单细胞能够得到保存。
13. 在层流通风橱中，将5μl新鲜混合的细胞裂解液加入到柔软的96孔微量滴定板或96管系统的管中。分选单精子到每一含溶液的孔或管中。在3个孔或管中分别加入20个精子，另8个孔或管中不加入任何精子作为阳性和阴性对照。

    如果许多精子样品被分选，对流式系统的全方位冲洗将是非常必要的（如第10步），这一在分选前的步骤将可以减少交叉污染的机会。

14. 结束后，用10%漂白剂冲洗然后用≥5ml的水冲洗仪器。
15. 将分选的精子在5μl细胞裂解液（第13步）65℃中孵育10～15min，可以使用水浴箱或适合微量滴定板和96孔系统的热循环仪。反应结束后加入5μl中和溶液，用石蜡膜好微量滴定板，最后在－20℃可保存数月且随时可以使用。

支持方案3 多重扩增单精子细胞

精子分型依赖于对目的DNA分子的有效扩增，通常需要两轮PCR以获得足够量的特异性产物，产物经电泳后用溴化乙锭染色检测。要确保所有靶位点在多重扩增中都可以得到高效扩增，引物的设计是很重要的，引物要有相近的退火温度，同时还要避免引物和它同一位点的引物或其他位点的引物形成引物二聚体。当需要扩增大量位点时，

要避免引物间的相互作用就变得相当棘手，作者通常通过仅扩增同一位点上的配对引物来寻找可能的引物二聚体。采用这一方法，曾成功地同时扩增多达 16 个位点，并且所有位点的扩增效率都在 90%以上。其他可以优化单细胞多重扩增效果的因素有低引物浓度和 PCR 第一个循环中可变的退火和延伸温度（基本方案 1，第一轮 PCR）。其他用于多重扩增的策略还包括采用带有 5′通用末端的基因座特异性引物。

支持方案 4　采用引物延伸预扩增（PEP）技术对单个细胞 DNA 进行全基因组扩增

引物延伸预扩增（PEP）是一种可以用于单精子全基因组扩增的方法。

附加材料（基本方案 1）

400mmol/L Poly N 15 个碱基的随机引物（操纵子）

冻存于 96 孔微量滴定板的已分选、裂解并中和了的单精子（基本方案 1）

注意：所有的试剂应用超纯水配制。

1. 准备以下 PEP 试剂（进行 100 次反应的量）：
   500μl 10×无钾离子扩增缓冲液（终浓度 1×）；
   500μl 400mmol/L Poly N 15 个碱基的随机引物（终浓度 40μmol/L）；
   250μl 2mmol/L 4dNTP 混合液（每管终浓度 100μmol/L）；
   100μl 5U/μl *Taq* DNA 聚合酶（终浓度 0.1U/μl）；
   用水调整至总体积 4ml。
2. 将已载有裂解中和的单精子和对照的微量滴定板解冻。微量滴定板的每个孔均有一个单精子样本或对照。每孔加入 40μl PEP 反应试剂，混匀。如果 PCR 仪没有配置加热盖，那么每个孔应覆盖一层轻质液体石蜡油。采用以下扩增循环进行 PEP。

第一步：	5min	95℃	（变性）
50 个循环：	2min	37℃	（复性）
	10s/℃	37℃升至 55℃	
	4min	55℃	（延伸）
	1min	92℃	（变性）
最后一步：	5min	72℃	（延伸）

3. 将载有预扩增产物的 96 孔微量滴定板 4℃稳定、永久保存。

基本方案 2　精子分型数据分析

须考虑的样本含量

0.5cM 的遗传学距离转变为 0.005 的重组率，表明要发生 5 起重组事件，平均需要观察 1000 例 scoreable 减数分裂。根据泊松分布（假定重组事件间相互独立、互不干扰），那么在上述事例中，有约 56%的可能性观察到至少 5 起重组事件，有约 88%的可能性观察到至少 3 起重组事件。

重组频率的最大可能估计值和基因座顺序

两点和三点基因定位

采用可对精子分型数据进行完整统计学分析的计算机软件（TWOLOC 和 THREE-LOC），对原始的两点和三点杂交的精子分型数据进行数学分析。

如果 PCR 扩增是完全有效的（即样本中存在的每一个等位基因都可被检测到），在没有外源 DNA 污染和微量滴定板的每个孔中严格地只有一个单倍体精子的情况下，那么只有预期产生的亲本型和重组型精子类型可被观察到；然而，如同所有的实验数据，由精子分型产生的数据都存在误差。对于任一基因座，均可观察到一小部分同时没有或同时都有两个等位基因的精细胞。这可能是由于：单个精子中存在的单个等位基因的检出效率<100%、污染事件、样本中含有多个或不含精子，以及这些误差的不同组合。TWOLOC 和 THREELOC 软件采用的计算机模型考虑到了这些误差。该软件可对以下四种参数进行估计并提供了它们的标准误差：效率；污染；重组率；包含 0、1 或 2 种精子的样本率。此外，符合系数可详细说明邻近区间重组事件间的独立程度，THREE-LOC 可对符合系数做出估计从而分析干扰因素。两种程序均以表格的形式输入数据，内容包括所有观察到的精子单体型以及每种单体型被观察到的次数。除了一般模型外，还有一些对效率和污染参数存在不同假设的辅助模型，程序可在这些模型下进行分析。TWOLOC 和 THREELOC 软件都可计算相位/顺序不同组合的最大似然。TWOLOC 和 THREELOC 软件被限制，不可以同时考虑超过三个位点。并且，来自每个精子供者个体的数据必须分开分析。

这里提及的计算机软件和文件都可从 Dr. Ken Lange 获得，生物统计学系，洛杉矶加州大学。

多点基因定位

对于精子分型数据进行多点基因定位的策略是由本来用于人类系谱数据遗传连锁分析的 MENDEL 程序发展而来的。如同 TWOLOC 和 THREELOC，这一新版本考虑了实验误差，也对同样的四种参数（包括它们的标准误差）进行估计。此外，它还估计标记顺序和男性重组频率。父亲的基因型被当作捐赠者的实际基因型，并携带有指定的相位和顺序。假定其母亲在所有分析位点都是杂合的，并与程序的预期一致，而且每一个被分析精子都作为一个孩子来处理。精子（或孩子）的基因型包括了来自于精子捐赠者的等位基因组合。母亲的基因型和双亲的表型被当作无关。对 MENDEL 的改编使得通过分析联合若干不同个体的多个位点来构建一张多点连锁图谱成为可能，即使对任一精子捐赠者只有部分位点被成功分型。当对多个位点进行分型时须给定数据计算的复杂性，这一程序根据特定的相位/顺序组合，总是有条件地计算似然，并且不考虑干扰因素。它可结合来自捐赠者不同位点组合的分型数据进行分析。更为复杂的实验设计被运用到了该模型中，包括再次检验通过 PEP 获得的确定位点。这些方面在 MENDEL 文件中有更为全面的详述。该程序以表格的形式输入数据，内容包括每套微量滴定孔（或管）的结果，捐赠者单体型与假定母亲适合的单体型。

精子分型数据分析的策略方法

1. 小心注意单体型评分、数据输入及数据核对。由于单体型评分这项工作很冗长，因此推荐数据独立评分；并且任何偏差都应仔细研究。当出现不确定的案例时，须考虑采用 PEP 对精子重新分型（支持方案 4）。
2. 针对数据集，主要依据已分型位点数目和实验设计来选择适当的软件。
3. 采用 TWOLOC、THREELOC 或 MENDEL，通过对系统参数污染和效率的不同设定，测试由一般模型得来的若干不同辅助模型。最准确的模型（也就是一般模型）解释了每个基因座上的每个等位基因可变的污染程度和可变的扩增效率；然而，依照统计模型的一般性原则，对特定的模型最好不要过度参数化，因为这可能人为地导致数据与模型吻合良好。因此，最好是有可能存在的最简单的模型，它几乎能完整地说明数据。

从作者的实验和数据分析可以清楚地看到，针对重组频率的高分辨率的测量方法有赖于三个因素：提高微量滴定孔或管中等位基因的扩增效率和检出率；降低污染频率；降低微量滴定孔或管中出现 0 或多于 1 个精子的频率。不可避免的实验误差造成的信息丢失可以通过加大研究样本数来弥补。

连锁数据的直接分析

在一组紧密连锁的遗传标记顺序已知的情况下，通过比较不同区间内重组频率，采用 TWOLOC、THREELOC 或 MENDEL，那么就无需估计重组频率和关联的精子分型误差。反之，不同区间内的重组类型数目则能被直接计算和比较。考虑一个杂合子个体有四个紧密连锁的遗传标记 A、B、C 和 D，并且已知顺序和相位 ABCD/abcd，BC 区间内的重组有待探讨。假定采用 PEP 对遗传标记 B 和 C 进行分型并且观察到了 Bc 这一重组类型的精子。这可能是真实的重组事件也可能是分型出现的误差。如果采用 PEP 再对同一精子内的遗传标记 A 和 D 进行分型，那么就可以区分这些可能性了。如果发现精子有 ABcd 基因型，那么 BC 区间内被认为肯定发生了重组事件，但是 ABcD 基因型则不能起确认作用。可以计算任一区间内确认的重组类型的数目，并同其他区间内确认的重组类型的数目做比较。以这种方式，如携带有一重组热点的染色体片段可以被连续地分成越来越小的区间直到确定有热点活性的最小区间。

基本方案 3　基于单体型传递的分离偏斜

单精子细胞分析非常适用于对单体型父系传递的研究，尤其是在致病单体型相对于正常单体型可能存在优势传递的情形下。Spermseg（http://galton.uchicago.edu/~mcpeek/software/spermseg）就是专门为分析单精子细胞单体型分离而开发的计算机程序。在这些病例中需要输入的核心信息包括所有可能双遗传标记单体型的计数、遗传标记之间的重组率及每个遗传标记和认定的致病基因之间的重组率。单遗传标记单体型的计数可能也包括其中，但不是必需的。需要注意的是只有遗传标记是杂合的捐赠者才予以考虑，因为纯合的遗传标记在单体型分离中并不提供信息。该软件可区分不同捐赠者甚至同一捐赠者的遗传标记，但只在一给定的精子细胞同时考虑两个遗传标记的情况

下。该软件的输出信息包括单体型分离的若干相关参数和遗传标记扩增效率的估计。特定模型的选择，连同置信区间，符合已分析模型的最大log似然值，以及具有基于给定P值的相应模拟的拟合优度检验模型的值；然而，根据提供的log似然值，可在软件外部对不同的模型做统计学上的比较。

参考文献：Arnheim and Shibata，1997；Goradia and Lange，1990

编者：Sigbjorn Lien，Esther P. Leeflang，Rene Hubert，Lin Zhang，Karin Schmitt，and Norman Arnheim

单元1.4 采用LINKAGE软件包进行连锁分析

本单元将对案例遗传模式已知时的人类遗传连锁分析做一个基本介绍（遗传模式定义见单元1.5）

优势对数值

LOD值（logarithm of the odds of linkage，优势对数值）通常也称为z值。两点LOD值是指在某个家系中，两个位点在某个θ值（两点间的重组分数）呈连锁的概率与在$\theta=0.50$时不呈连锁的概率比的常用对数值。

$$\text{两点 LOD 值} = z(\theta) = \log_{10}\frac{L(\text{Ped} \mid \theta = x)}{L(\text{Ped} \mid \theta = 0.50)}$$

式中，L代表可能性；x表示0～0.49范围内任意θ值。在一个给定的遗传模式下，两点LOD值解释如下：当LOD≥3.0时认为是显著性连锁；当LOD≤－2.0时肯定不连锁；－2.0<LOD<3.0不能下结论，需要增加家系数目或者家系内的样本数或者标记位点的信息含量才能进一步确定。

LOD值为3.0等于支持连锁的比值是10^3（1000∶1）。然而这个结果并不是说犯错误的机会（假阳性）是1/1000。在考虑任意两个位点可能连锁的先验概率（如果位点是可被遗传的，那么它们在染色体上的位置必定是相互连锁的），LOD值为3.0时是假阳性的经验概率是约1/20或5％。

两点连锁分析可以扩展到多点连锁分析，允许同时考虑多个位点。多点LOD值类似两点LOD值，区别在于两点LOD值比较位点A与位点B之间的重组分数，多点LOD值比较位点A与位置固定的一系列位点（B、C、…、Z）。例如，假设位置固定的一系列位点包括3个标记，其顺序如图1.4.1所示，研究者有一个疾病家系，想确定疾病基因是否与这一系列位点有关，是位于位点A的旁边还是在位点B的旁边，或者与这一系列标记不连锁。如果疾病位点与这个区域连锁，如图1.4.1所示，疾病位点将有4个可能的位置。

多点LOD值的计算允许对这4个位置进行估算。对于疾病位点的位置在一系列固定的位点之外的，多点LOD值的计算公式如下：

$$\text{多点 LOD 值} = \log_{10}\frac{L(\text{Ped} \mid \theta_{\text{A-B}}, \theta_{\text{B-C}}, \theta_{\text{disease}=x})}{L(\text{Ped} \mid \theta_{\text{A-B}}, \theta_{\text{B-C}}, \theta_{\text{disease}=0.50})}$$

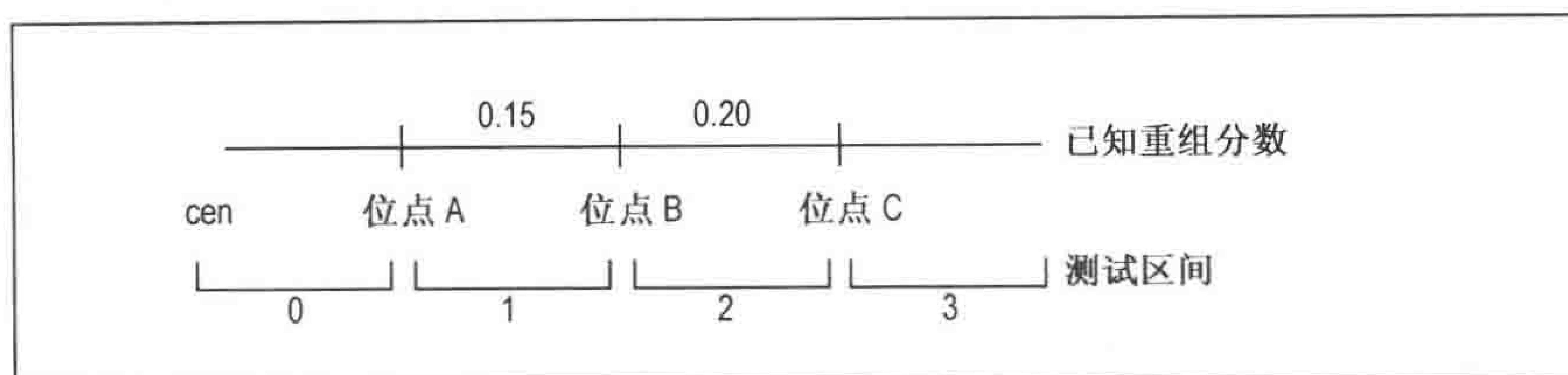


图 1.4.1　遗传学图示标记 A 与 B 和标记 B 与 C 之间的重组分数，多点连锁分析沿着指定的 4 个区间进行测试。

式中，x 代表一系列固定的位点与疾病位点之间的重组分数，分母假设这一系列固定的位点与疾病位点之间不连锁，类似于两点连锁分析时假设两个位点之间相互不连锁。

例如，在计算 0 位置的多点 LOD 值时，研究者可能想知道：疾病位点是否位于这一系列固定的位点的 A 位置 5cM 之内，那么在这时多点 LOD 值的计算公式如下：

$$多点\ LOD\ 值 = \log_{10}\frac{L(\text{Ped} \mid \theta_{\text{disease-A}=0.05}, \theta_{\text{A-B}=0.15}, \theta_{\text{B-C}=0.20})}{L(\text{Ped} \mid \theta_{\text{disease-A}=0.05}, \theta_{\text{A-B}=0.15}, \theta_{\text{B-C}=0.20})}$$

在文献中，location score 这个术语常作为多点 LOD 值的同义词出现，但二者之间有区别。location score 是概率比的自然对数值而 LOD 值是概率比的常用对数值。自然对数值（location score）除以 4.6 即等于常用对数值（LOD 值）（例如，自然对数值 30.5 等于多点 LOD 值 6.63）。

位点类型

Linkage 程序在分析中可以考虑四种类型的位点：数量性状、共显性、二元因子和受累状态。二元因子位点考虑指定的并非共显性标记，如 ABO 血型；数量性状位点描述连续的而非离散的表型，如肌酸激酶或者血清无机磷水平；共显性位点是指微卫星标记或单核苷酸多态性（SNP）之类的、每个等位基因都有可分辨的表型的位点；受累状态位点是指家系中每个成员都具有或不具有某种性状，或者可能具有某种性状。这些表型上的差异可以通过进行一系列易患性分类来描述。

易患性分类

对于受累状态位点，LINKAGE 程序可以考虑不同的外显率。在一个易患性群体中，对于三种不同的基因型，可以编码三个不同的外显率与之相对应。对于一个受累状态位点，LINKAGE 程序还可以考虑多个易患性群体。

环

环是指在一个家系中，从某个成员 X 出发，根据亲缘关系画线，在不折回、线不断的前提下，又能回到 X。通常环包括血缘环和婚姻环。血缘环是近亲结婚的结果。当一个家系中的兄弟俩与另外一个家系中的姐妹俩分别结婚之类的情况发生时，家系中就会出现婚姻环。两种类型的环都会形成所谓复杂的家系结构。在 LINKAGE 程序中，环必须通过复制家系中的个体的方式被打断——欲知更多的信息，请参考 LINKAGE 文件及 Terwilliger 和 Ott（1994）。在使用 LINKAGE 软件的 MAKEPED 程序时会检

查家系中是否存在环并提醒使用者要破环。

图谱功能

假设在某种干涉水平下，地图功能提供遗传距离（cM）与重组率之间的转换。正干涉现象是指在一个区间内一个交换的出现会抑制同一区间内另一个交换的发生，负干涉现象是指一个交换的出现会促进同一区间内另一个交换的发生。在人类的连锁分析中，两种最常用的干涉水平的假设一是Haldane水准：它假设没有干涉；另一个是Kosambi水准：它假设一个中间水平的干涉，认为在一段很小的遗传距离内，双交换的发生是很罕见的；但遗传距离越大，这种可能性随之增加。

LINKAGE软件中的MLINK和LINKMAP都需要使用者输入位点间重组分数的数据，如果你仅仅知道cM表示的图距，MAPFUN就能帮助你完成图距与重组率之间的转换。

连锁分析的程序

连锁分析最常用的软件包是LINKAGE，这个软件包所使用的算法如图1.4.2所示，该软件可以从http://linkage.rockefeller.edu免费下载。在“连锁分析软件”的标题下，一系列有用的软件以及下载程序和获得程序文件的细节信息都可以得到。

MAKEPED

MAKEPED是一个批处理程序，能将“pre-MAKEPED”或者简称“pre-”文件中的家系结构、受累状态和每一个标记的基因型等信息转换成适合LINKAGE软件进行连锁分析的格式。MAKEPED检查家系输入文件各种结构的不一致性（如同一性别的双亲），添加指针指向LINKAGE软件遍历和一个先证者文件（参见例1）。

PREPLINK

PREPLINK(http://linkage.rockefeller.edu/gui/webpreplink.html)是为连锁分析准备一个参数文件的软件。通过提醒使用者指定遗传模式（如外显率、等位基因频率）和所需的分析方式等（如重组分数的初始值），PREPLINK有助于确保使用者生成正确格式参数文件。

LCP

LCP（LINKAGE控制软件）准备批处理文件，它们在一定的命令下将激活分析程序。LCP中，来自于MAKEPED和PREPLINK程序的输出文件：家系文件和参数文件是必须输入的。LCP容许使用者指定不同的分析方式。

UNKNOWN

在激活任何LINKAGE程序之前，UNKNOWN必须被运行。首先，它检查输入的家系文件数据的一致性，如果发现不一致的情况将提醒你。其次，UNKNOWN浏览家系，删除任何不可能的基因型对于这些疾病或标记状态未知的个体，增加连锁分析的

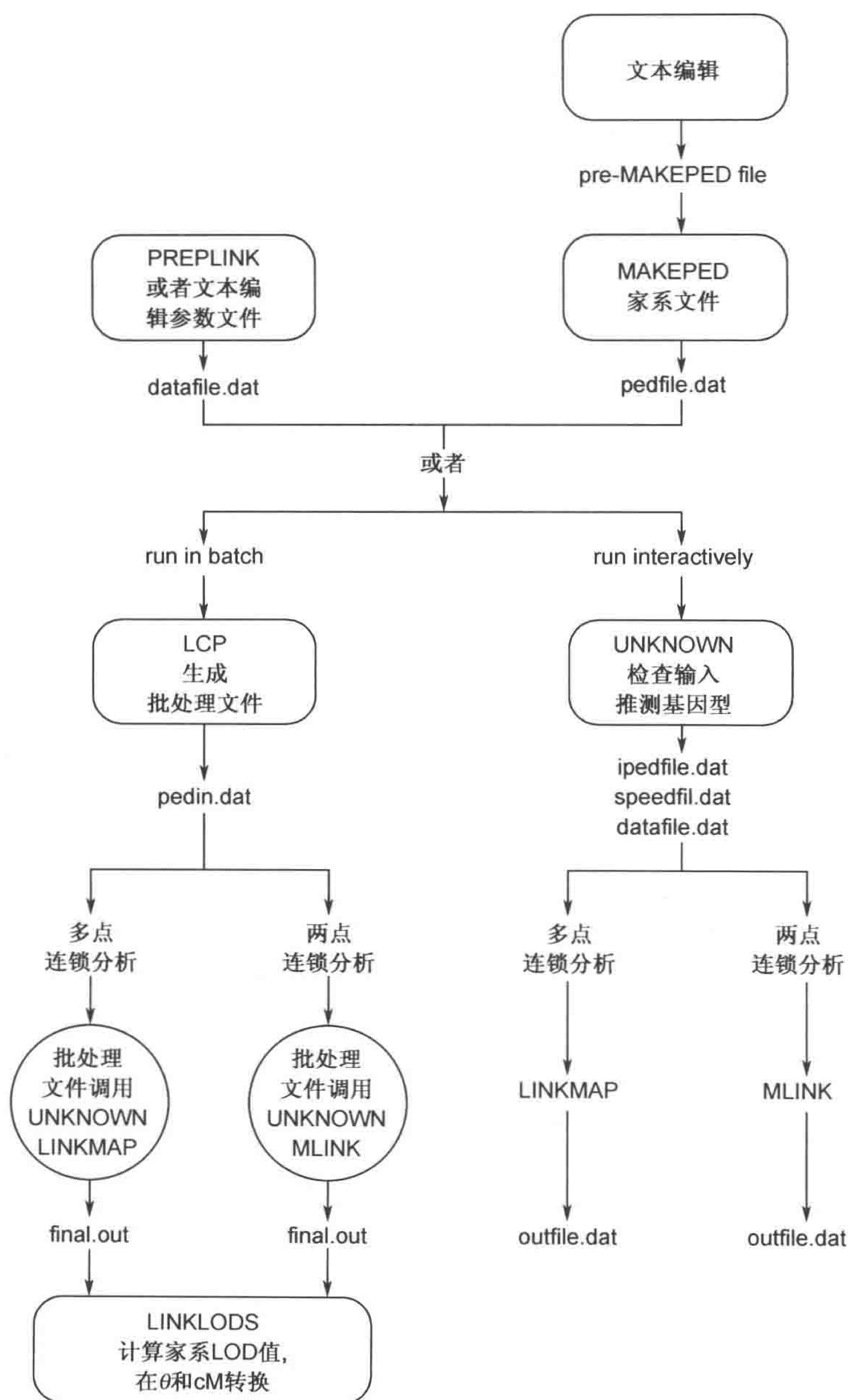


图 1.4.2　LINKAGE 程序进行连锁分析流程图。

速度。

MLINK

MLINK 计算在你指定的 θ 值下家系的似然性，似然性可被转化成 LOD 值。通常情况下，MLINK 用来分析某个疾病或性状位点与遗传标记之间连锁与否的可能性，尽管两个遗传标记位点也可使用。MLINK 分析常被称为两点连锁分析。MLINK 也是唯一能计算指定个体遗传风险的程序。

LINKMAP

有时，研究者想知道一个遗传标记或者疾病性状相对于一系列次序和距离已知的遗传标记的关系。LINKMAP 允许研究者固定两个或多个遗传标记的次序与距离，将这个位置未知的位点置于任何可能的区间计算似然性。

LINKLODS

LINKLODS 将 MLINK 或 LINKMAP 分析结果的输出文件作为输入文件，计算指定家系的 LOD 值。LINKLODS 将执行必需的减法来获得多点 LOD 值。另外，LINKLODS 可根据 Kosambi 或 Haldane 干涉水平，将分析时指定的 θ 值换算成用 cM 表示的遗传距离。

HOMOG

HOMOG 软件可用来分析一系列家系中是否存在遗传异质性。也就是说，HOMOG 有助于回答这个问题："在这些家系中，是一个位点还是多个位点导致这种疾病表型?"

方法与实例

我们通过如表 1.4.1 的四个例子来具体学习 LINKAGE 程序的使用。

表 1.4.1 实例概述

例子	连锁分析的方法	疾病	特征	描述
1	两点连锁分析	常染色体显性遗传，不完全外显	不连锁的标记	MAKEPED 生成家系文件；文本编辑生成参数文件 UNKNOWN MLINK
2	多点连锁分析	常染色体显性遗传，不完全外显	为了确定疾病区间添加的标记	LINKMAP LINKLODS MAPFUN
3	两点连锁分析	常染色体显性遗传，不完全外显	外显率与年龄有关	根据年龄与发病关系的曲线，进行易患人群分类
4	两点连锁分析	X 染色体连锁遗传，完全外显		对受累状态位点进行易感人群分类

例 1 常染色体显性遗传病与一个不连锁的遗传标记的两点连锁分析

在这个例子中，两点连锁分析证明一个遗传标记与疾病位点不连锁。这是一个常染色体显性遗传病，致病等位基因频率为 0.01，疾病外显率为 0.8。为了筛查疾病位点，一系列的遗传标记将被选择对该家系进行基因分型。如果存在已知的候选区域，那么这些区域将被首先测试（如低钾性周期性麻痹与钙通道运输有关的遗传标记）。如果没有已知的候选区域，常常根据遗传标记的杂合度和基因分型的难易程度来进行选择；遗传标记的杂合度越高，在家系中的信息含量则可能越高，提供的有用的连锁信息则可能越多。如图 1.4.3 所示，本例子家系中选用的第一个遗传标记的杂合度就比较高。

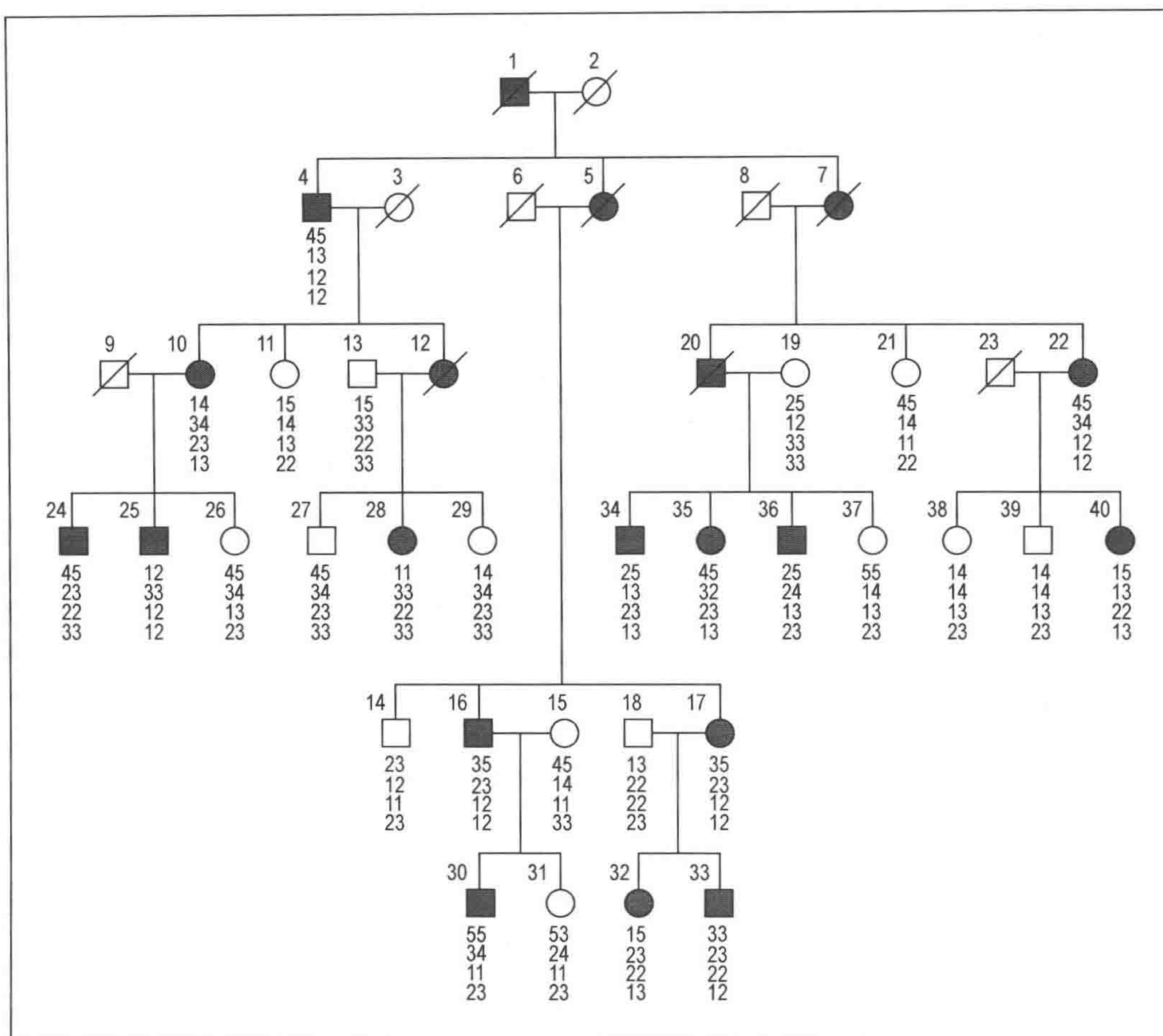


图 1.4.3　家系 1113 的家系图。圆圈代表女性个体，方框代表男性个体。阴影表示疾病受累个体，无阴影表示正常。画斜线的个体表示已经死亡，不能进行基因分型。遗传标记 1、2、3 和 4 基因分型的结果排列在相应个体的下方。

准备家系文件

研究者可以使用文本编辑器准备一个简单的格式化了的文件，通常指“pre-MAKEPED”文件。家系中每个个体占文本的一行。图 1.4.3 中的家系的 pre-MAKEPED 文件如图 1.4.4 所示，命名为 marker1. pre。在这个家系中，前面的 5 栏是常量，其余栏是受累状态的信息和遗传标记的数据。每一栏之间用空格键隔开。换句话说，每个值必须被至少一个空格分隔开。在这个例子中，第 6～8 栏是受累状态和遗传标记 1 的两个等位基因。第 7 和第 8 栏的顺序可以互换，即基因型 2/3 可以输入成 3/2。

第 1 栏：家系编号；

第 2 栏：家系中个体的编号；

第 3 栏：前一栏个体的父亲的编号；

第 4 栏：上述个体的母亲的编号；

第5栏：个体的性别（1表示男，2表示女）；

第6栏：个体受累状态（2表患者，1表正常，0表未知）；

第7栏：遗传标记1的第一个等位基因；

家系编号	个体编号	父系编号	母系编号	性别	受累状态	等位基因1	等位基因2
1113	1	0	0	1	2	0	0
1113	2	0	0	2	1	0	0
1113	3	0	0	2	1	0	0
1113	4	1	2	1	2	4	5
1113	5	1	2	2	2	0	0
1113	6	0	0	1	1	0	0
1113	7	1	2	2	2	0	0
1113	8	0	0	1	1	0	0
1113	9	0	0	1	1	0	0
1113	10	4	3	2	2	1	4
1113	11	4	3	2	1	1	5
1113	12	4	3	2	2	0	0
1113	13	0	0	1	1	5	1
1113	14	6	5	1	1	3	2
1113	15	0	0	2	1	5	4
1113	16	6	5	1	2	3	5
1113	17	6	5	2	2	3	5
1113	18	0	0	1	1	3	1
1113	19	0	0	2	1	5	2
1113	20	8	7	1	2	0	0
1113	21	8	7	2	1	5	4
1113	22	8	7	2	2	4	5
1113	23	0	0	1	1	0	0
1113	24	9	10	1	2	4	5
1113	25	9	10	1	2	1	2
1113	26	9	10	2	1	5	4
1113	27	13	12	1	1	5	4
1113	28	13	12	2	2	1	1
1113	29	13	12	2	1	1	4
1113	30	16	15	1	2	5	5
1113	31	16	15	2	1	5	3
1113	32	18	17	2	2	1	5
1113	33	18	17	1	2	3	3
1113	34	20	19	1	2	2	5
1113	35	20	19	2	2	4	5
1113	36	20	19	1	2	2	5
1113	37	20	19	2	1	5	5
1113	38	23	22	2	1	1	4
1113	39	23	22	1	1	1	4
1113	40	23	22	2	2	1	5

图1.4.4 根据例1的家系1113所编辑的Pre-MAKEPED文件（marker1.pre）。

第 8 栏：遗传标记 1 的第一个等位基因。

当有些值无法得到时，必须插入 0 作为占位符号。例如，图 1.4.3 的个体 1 没有遗传标记的数据，奠基的父母；那么，在图 1.4.4 中，他的父母亲及标记 1 的等位基因 1 和 2 都编码为 0。虽然不一定需要，但在“pre-MAKEPED”文件中，这类数据经常会发现在合适的栏目中。尽管这个例子中只有一个家系，但在“pre-MAKEPED”文件中可以有多个家系存在。

1. 激活 MAKEPED 程序。键入 MAKEPED 命令以及输入和输出文件的名称：makeped marker1. pre marker1. ped。
2. 在程序的提示下，表明家系中是否有环存在。图 1.4.3 中的家系没有环，因此回答“n”。但是，如果家系中有环存在，则应该回答“y”，同时根据提示，指定哪一个个体被重复，被重复个体是交互式输入还是读入另外一个文件来输入。具体细节请参看 LINKAGE 相关文件。
3. 根据程序提示，回答先证者是由程序自动选择还是研究者指定，是交互式输入还是读入另外一个文件来输入。在没有近亲结婚的家系中，先证者编码为 1，其他人编码为 0。除非要计算风险度，程序自动选择都是可行的。“post-MAKEPED”文件格式如下。

   第 1 栏：家系编号；

   第 2 栏：家系中个体的编号；

   第 3 栏：前一栏个体的父亲的编号；

   第 4 栏：上述个体的母亲的编号；

   第 5 栏：个体的第一个后代的编号；

   第 6 栏：个体的第一个（或者下一个）的父系来源的同胞的编号；

   第 7 栏：个体的第一个（或者下一个）的母系来源的同胞的编号；

   第 8 栏：个体的性别（1 表示男，2 表示女）；

   第 9 栏：先证者（1 为先证者，0 为否）；

   第 10 栏：个体受累状态（2 表示患者，1 表示正常，0 表示未知）；

   第 11 栏：遗传标记 1 的第一个等位基因；

   第 12 栏：遗传标记 1 的第一个等位基因。

   图 1.4.5 示 marker1. ped 的“post-MAKEPED”文件。
4. 为了直接输入 linkage 程序，重新命名 post-MAKEPED 文件。为了一致，常常将所有的 pre-MAKEPED 家系文件命名为 a. pre，将所有的 post-MAKEPED 家系文件命名为 a. ped。

准备参数文件

5. 对于家系 1113 的遗传标记 1 的参数文件也可使用文本编辑器来准备，编辑好的文件如图 1.4.6。在这个例子中，参数文件有 14 行，为了描述方便，每一行左边用斜体字标记；这些行的提示在正式的连锁分析的参数文件中是不存在的。在有些行中的“<”后面出现文本，这些文本是可根据研究者的需要选择。

家系编号	个体编号	父系编号	母系编号	第一后代	紧随父系同胞	紧随母系同胞	性别	先证者	受累状态	等位基因1	等位基因2		
1113	1	0	0	4	0	0	1	1	2	0	0	Ped: 1113	Per: 1
1113	2	0	0	4	0	0	2	0	1	0	0	Ped: 1113	Per: 2
1113	3	0	0	10	0	0	2	0	1	0	0	Ped: 1113	Per: 3
1113	4	1	2	10	5	5	1	0	2	4	5	Ped: 1113	Per: 4
1113	5	1	2	14	7	7	2	0	2	0	0	Ped: 1113	Per: 5
1113	6	0	0	14	0	0	1	0	1	0	0	Ped: 1113	Per: 6
1113	7	1	2	20	0	0	2	0	2	0	0	Ped: 1113	Per: 7
1113	8	0	0	20	0	0	1	0	1	0	0	Ped: 1113	Per: 8
1113	9	0	0	24	0	0	1	0	1	0	0	Ped: 1113	Per: 9
1113	10	4	3	24	11	11	2	0	2	1	4	Ped: 1113	Per: 10
1113	11	4	3	0	12	12	2	0	1	1	5	Ped: 1113	Per: 11
1113	12	4	3	27	0	0	2	0	2	0	0	Ped: 1113	Per: 12
1113	13	0	0	27	0	0	1	0	1	5	1	Ped: 1113	Per: 13
1113	14	6	5	0	16	16	1	0	1	3	2	Ped: 1113	Per: 14
1113	15	0	0	30	0	0	2	0	1	5	4	Ped: 1113	Per: 15
1113	16	6	5	30	17	17	1	0	2	3	5	Ped: 1113	Per: 16
1113	17	6	5	32	0	0	2	0	2	3	5	Ped: 1113	Per: 17
1113	18	0	0	32	0	0	1	0	1	3	1	Ped: 1113	Per: 18
1113	19	0	0	34	0	0	2	0	1	5	2	Ped: 1113	Per: 19
1113	20	8	7	34	21	21	1	0	2	0	0	Ped: 1113	Per: 20
1113	21	8	7	0	22	22	2	0	1	5	4	Ped: 1113	Per: 21
1113	22	8	7	38	0	0	2	0	2	4	5	Ped: 1113	Per: 22
1113	23	0	0	38	0	0	1	0	1	0	0	Ped: 1113	Per: 23
1113	24	9	10	0	25	25	1	0	2	4	5	Ped: 1113	Per: 24
1113	25	9	10	0	26	26	1	0	2	1	2	Ped: 1113	Per: 25
1113	26	9	10	0	0	0	2	0	1	5	4	Ped: 1113	Per: 26
1113	27	13	12	0	28	28	1	0	1	5	4	Ped: 1113	Per: 27
1113	28	13	12	0	29	29	2	0	2	1	1	Ped: 1113	Per: 28
1113	29	13	12	0	0	0	2	0	1	1	4	Ped: 1113	Per: 29
1113	30	16	15	0	31	31	1	0	2	5	5	Ped: 1113	Per: 30
1113	31	16	15	0	0	0	2	0	1	5	3	Ped: 1113	Per: 31
1113	32	18	17	0	33	33	2	0	2	1	5	Ped: 1113	Per: 32
1113	33	18	17	0	0	0	1	0	2	3	3	Ped: 1113	Per: 33
1113	34	20	19	0	35	35	1	0	2	2	5	Ped: 1113	Per: 34
1113	35	20	19	0	36	36	2	0	2	4	5	Ped: 1113	Per: 35
1113	36	20	19	0	37	37	1	0	2	2	5	Ped: 1113	Per: 36
1113	37	20	19	0	0	0	2	0	1	5	5	Ped: 1113	Per: 37
1113	38	23	22	0	39	39	2	0	1	1	4	Ped: 1113	Per: 38
1113	39	23	22	0	40	40	1	0	1	1	4	Ped: 1113	Per: 39
1113	40	23	22	0	0	0	2	0	2	1	5	Ped: 1113	Per: 40

图 1.4.5　例 1 的 Post-MAKEPED 家系文件（marker1.ped）。

第 1 行

第 1 栏：准备分析的位点数目；

```
line 1    2 0 0 5  << NO. OF LOCI, RISK LOCUS, SEXLINKED (IF 1) PROGRAM
line 2    0 0.0 0.0 0 << MUT LOCUS, MUT MALE, MUT FEM, HAP FREQ (IF 1)
line 3    1  2
line 4    1   2  << AFFECTION, NO. OF ALLELES
line 5    0.9900 0.010000   << GENE FREQUENCIES
line 6    1 << NO. OF LIABILITY CLASSES
line 7    0.0 0.80 0.80 << PENETRANCES
line 8    3   5  << ALLELE NUMBERS, NO. OF ALLELES
line 9    0.20 0.30 0.10 0.10 0.30
line 10   0 0  << SEX DIFFERENCE, INTERFERENCE (IF 1 OR 2)
line 11   0.0 << RECOMBINATION VALUES
line 12   1 0.001 0.001 << REC VARIED, INCREMENT, FINISHING VALUE
line 13   0.05 0.05 0.15
line 14   0.20 0.10 0.40
```

图 1.4.6　例 1 的参数文件（marker1. dat）。

第 2 栏：在不计算遗传风险度的情况下输“0”，否则输入“1”；

第 3 栏：指定遗传方式，常染色体遗传输入“0”，性连锁输入“1”；

第 4 栏：选用程序的编码，分别是 1 代表 CLINK、2 代表 CMAP、3 代表 ILINK、4 代表 LINKMAP、5 代表 MLINK、6 代表 LODSCORE、7 代表 CLODSCORE（关于这些程序的简要描述请参见表 1. 4. 2）。

表 1. 4. 2　LINKAGE 软件包可用程序

程序代码	程序名称	描述
1	CLINK	ILINK 优化版，主要用于三代的 CEPH 类型的家系
2	CMAP	LINKMAP 优化版，主要用于三代的 CEPH 类型的家系
3	ILINK	用于一般的家系，在连锁分析时可使用各种参数（如外显率、基因频率、重组率等）估计最大似然值
4	LINKMAP	用于一般的家系，计算多点 LOD 值或自然对数值
5	MLINK	用于一般的家系，计算两点 LOD 值或进行危险度估计
6	LODSCORE	用于一般的家系，在两点连锁分析时允许计算最大 LOD 值和相关的重组分数
7	CLODSCORE	LODSCORE 优化版，主要用于三代的 CEPH 类型的家系

第 2 行

第 1 栏：如果结合突变率，输入“1”，否则输入“0”；

第 2 和第 3 栏：如果考虑突变，分别指定男女突变率；否则输入“0”；

第 4 栏：如果分析时考虑位点间连锁不平衡，输入“1”；如果认为符合 Hardy-Weinberg 平衡，输入“0”。

第 3 行

指明要分析的位点的顺序。两点连锁分析，在这一行指示为 1 2 或为 2 1 都是一样的。多点连锁分析时，位点间的顺序更重要。

第 4～9 行

关于位点的信息。LINKAGE 分析可以定义四种不同类型的位点：数量性状、共显

性、二元因子和受累状态位点。在这个文件中，有6行是用来描述要研究的两个位点的情况的：4～7行指明受累状态位点的情况，8和9行指明欲研究的位点等位基因数目及频率（更多的细节请参见LINKAGE相关文件）。

第10行

指明重组是否存在性别差异或是否干涉。MLINK程序只支持两者都无差异。

第1栏：0表示男女在重组上没有区别；1表示男女在重组上有区别且各个区间的交换是常量；2表示男女在重组上有区别且各个区间交换有区别。MLINK必须选择“0”。

第2栏：0表示没有干涉，1表示干涉由研究者指定，2表示干涉在Kosambi水平上。

第11行

标明位点间开始的重组分数。当研究n个位点时，程序要求在这一行有$n-1$个值。如果有3个位点，程序要求2个值。例如，在这一行的值是0.20　0.05，那么位点1和2之间的重组率是20%，位点2和3之间的重组率是5%。如果只有2个位点，则只有一个值，0.0代表两点间没有重组。

第12行

第1栏：表明哪一个重组分数被改变。对于例中两点连锁分析，因为只有一个重组分数，输入“1”。

第2和第3栏：分别对应于计算时重组分数的增加和终止值。

第13和第14行

这是一个可以选择的行，它提供研究者在其他的指定重组分数计算LOD值的可能。

第1栏：计算LOD值的初始θ值；

第2栏：计算LOD值增加的θ值；

第3栏：计算LOD值终止的θ值；

在例1中，第13行指令程序在$\theta=0.05$、0.10和0.15时计算LOD值；第14行指令程序在$\theta=0.20$、0.30和0.40时计算LOD值。

执行分析

6. 在运行LINKAGE分析之前，首先复制家系文件和参数文件成为程序需要的输入文件。

```
copy marker1.ped pedfile.dat
copy marker1.dat datafile.dat
```

7. 用如下命令调用程序进行连锁分析

```
unknown
mlink
```

LINKAGE程序产生的输出文件名为outfile.dat。值得注意的是每次程序进行分析时产生的文件将覆盖上次的文件。因此为了防止分析结果被丢失，用下面的命令把输出结果另存为其他的文件是很重要的：

```
copy outfile.dat marker1.out
```

```
Length of real variables = 8 bytes
LINKAGE (V5.20) WITH  2-POINT AUTOSOMAL DATA
ORDER OF LOCI:   1  2
-----------------------------------
-----------------------------------
THETAS  0.500
-----------------------------------
PEDIGREE |  LN LIKE  | LOG 10 LIKE
-----------------------------------
     1113   -80.910210   -35.138783
-----------------------------------
TOTALS      -80.910210   -35.138783
-2 LN(LIKE) =  1.61820419737301E+0002 LOD SCORE =      0.000000
-----------------------------------
-----------------------------------
THETAS  0.000
-----------------------------------
PEDIGREE |  LN LIKE  | LOG 10 LIKE
-----------------------------------
     1113   -97.592953   -42.383991
-----------------------------------
TOTALS      -97.592953   -42.383991
-2 LN(LIKE) =  1.95185905504318E+0002 LOD SCORE =     -7.245208
-----------------------------------
-----------------------------------
THETAS  0.001
-----------------------------------
PEDIGREE |  LN LIKE  | LOG 10 LIKE
-----------------------------------
     1113   -95.771287   -41.592853
-----------------------------------
TOTALS      -95.771287   -41.592853
-2 LN(LIKE) =  1.91542573364822E+0002 LOD SCORE =     -6.454070
-----------------------------------
-----------------------------------
THETAS  0.050
-----------------------------------
PEDIGREE |  LN LIKE  | LOG 10 LIKE
-----------------------------------
     1113   -87.346339   -37.933952
-----------------------------------
TOTALS      -87.346339   -37.933952
-2 LN(LIKE) =  1.74692677422668E+0002 LOD SCORE =     -2.795169
-----------------------------------
-----------------------------------
THETAS  0.100
-----------------------------------
PEDIGREE |  LN LIKE  | LOG 10 LIKE
-----------------------------------
     1113   -85.688952   -37.214160
-----------------------------------
TOTALS      -85.688952   -37.214160
-2 LN(LIKE) =  1.71377904890767E+0002 LOD SCORE =     -2.075377
-----------------------------------
-----------------------------------
THETAS  0.150
-----------------------------------
PEDIGREE |  LN LIKE  | LOG 10 LIKE
-----------------------------------
     1113   -84.558795   -36.723340
-----------------------------------
TOTALS      -84.558795   -36.723340
-2 LN(LIKE) =  1.69117589371370E+0002 LOD SCORE =     -1.584557
-----------------------------------
-----------------------------------
THETAS  0.200
-----------------------------------
PEDIGREE |  LN LIKE  | LOG 10 LIKE
-----------------------------------
     1113   -83.678711   -36.341125
-----------------------------------
TOTALS      -83.678711   -36.341125
-2 LN(LIKE) =  1.67357421411557E+0002 LOD SCORE =     -1.202342
-----------------------------------
-----------------------------------
THETAS  0.300
-----------------------------------
PEDIGREE |  LN LIKE  | LOG 10 LIKE
-----------------------------------
     1113   -82.506840   -35.832189
-----------------------------------
TOTALS      -82.506840   -35.832189
-2 LN(LIKE) =  1.65013679193931E+0002 LOD SCORE =     -0.693406
-----------------------------------
-----------------------------------
THETAS  0.400
-----------------------------------
PEDIGREE |  LN LIKE  | LOG 10 LIKE
-----------------------------------
     1113   -81.673555   -35.470298
-----------------------------------
TOTALS      -81.673555   -35.470298
-2 LN(LIKE) =  1.63347109203385E+0002 LOD SCORE =     -0.331516
```

图 1.4.7　两点连锁分析结果。

结果分析

8. 两点连锁分析结果如图 1.4.7 所示。注意在所有的 θ 值下，LOD 值都是负值。尽管没有显著性连锁的证据，这个分析结果仍然提供了有用的信息：因为在所有的 θ 值下，LOD 值都<−2，该位点是疾病基因位点的可能性被排除。该分析假设指定了合适的遗传模式，对于这个家系来说，这个结果表明疾病基因位点不会落在 marker1 两边 10cM 之内的区间，整个基因组 20cM（约 0.6%）的区间被排除。

例 2　常染色体显性遗传病的多点连锁分析：通过评估增加的标记确定疾病基因位置

在这个例子中，在家系中对已经确定与疾病连锁的遗传标记附近的其他标记进行基因分型，再采用多点连锁分析方法去确定疾病基因相对于这一系列标记的位置。这种分析方式假定一个遗传图，在这个图中包括一个已经连锁的标记（图 1.4.3 的标记 3）和它两侧的两个标记（图 1.4.3 中的标记 2 和 4）。这些标记已经在家系成员中进行了基因分型，数据如图 1.4.3 所示。标记之间的性别平均重组分数如图 1.4.8 所示，两个标记的等位基因频率见表 1.4.3。疾病假设为常染色体显性遗传方式，致病基因频率为 0.01，疾病外显率为 80%。例中使用 LINKMAP 做多点连锁分析，LINKLODS 处理数据。作为 LINKLODS 的一个选择，MAPFUN 能用来对重组分数和遗传距离进行转换。多点连锁分析的家系文件（example2.ped）和参数文件（example2.dat）分别如图 1.4.9 和图 1.4.10 所示。家系文件中，每个个体 3 个标记的基因型按照参数文件中标记 2、3、4 的顺序列在同一行。

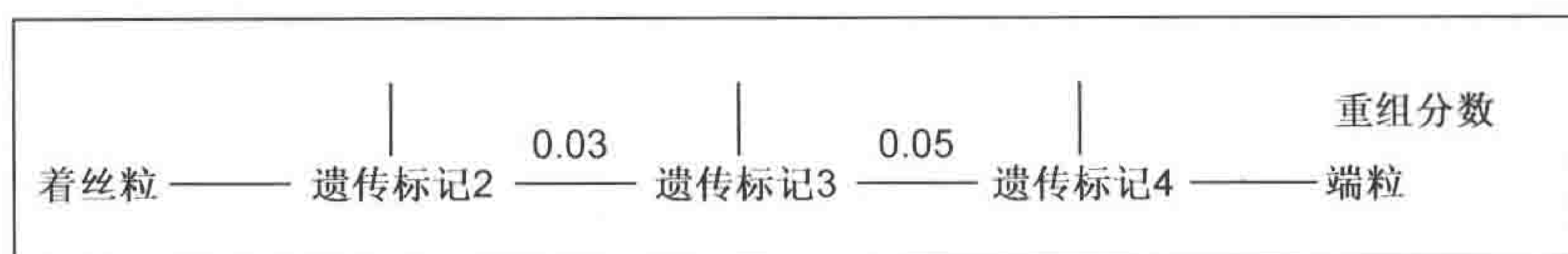


图 1.4.8　遗传标记 2，3，4 之间的重组分数。

表 1.4.3　家系 1113 中（图 1.4.3）遗传标记 2 和 4 的等位基因频率

遗传标记	等位基因			
	1	2	3	4
2	0.30	0.30	0.05	0.35
4	0.05	0.40	0.55	—

使用 LCP 准备批处理文件

1. 在第 3 屏，用箭头键选中 LINKMAP。按 Page Down 到第 4 屏，这时候允许选择测试区间，选择 Specific Interval 可以在任意区间指定计算 LOD 值的 θ 值的数目，按 Page Down 到下一屏。如果你希望在每一个区间都计算相同数目的 LOD 值，也可以选择 All Interval。
2. 在第 5 屏，指定在重组分数间是否存在性别的区别。在我们这个例子中，选择没有

家系编号	个体编号	父系编号	母系编号	第一后代	紧随父系同胞	紧随母系同胞	性别	先证者	受累状态	标记2 等位基因1	标记2 等位基因2	标记3 等位基因1	标记3 等位基因2	标记4 等位基因1	标记4 等位基因2		
1113	1	0	0	4	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	Ped: 1113	Per: 1
1113	2	0	0	4	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	Ped: 1113	Per: 2
1113	3	0	0	10	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	Ped: 1113	Per: 3
1113	4	1	2	10	5	5	1	0	2	1	3	1	2	1	2	Ped: 1113	Per: 4
1113	5	1	2	14	7	7	2	0	2	0	0	0	0	0	0	Ped: 1113	Per: 5
1113	6	0	0	14	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	Ped: 1113	Per: 6
1113	7	1	2	20	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	Ped: 1113	Per: 7
1113	8	0	0	20	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	Ped: 1113	Per: 8
1113	9	0	0	24	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	Ped: 1113	Per: 9
1113	10	4	3	24	11	11	2	0	2	3	4	2	3	1	3	Ped: 1113	Per: 10
1113	11	4	3	0	12	12	2	0	1	1	4	1	3	2	2	Ped: 1113	Per: 11
1113	12	4	3	27	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	Ped: 1113	Per: 12
1113	13	0	0	27	0	0	1	0	1	3	3	2	2	3	3	Ped: 1113	Per: 13
1113	14	6	5	0	16	16	1	0	1	1	2	1	1	2	3	Ped: 1113	Per: 14
1113	15	0	0	30	0	0	2	0	1	1	4	1	1	3	3	Ped: 1113	Per: 15
1113	16	6	5	30	17	17	1	0	2	3	2	1	2	1	2	Ped: 1113	Per: 16
1113	17	6	5	32	0	0	2	0	2	3	2	1	2	1	2	Ped: 1113	Per: 17
1113	18	0	0	32	0	0	1	0	1	2	2	2	2	2	3	Ped: 1113	Per: 18
1113	19	0	0	34	0	0	2	0	1	1	2	3	3	3	3	Ped: 1113	Per: 19
1113	20	8	7	34	21	21	1	0	2	0	0	0	0	0	0	Ped: 1113	Per: 20
1113	21	8	7	0	22	22	2	0	1	1	4	1	1	2	2	Ped: 1113	Per: 21
1113	22	8	7	38	0	0	2	0	2	3	4	1	2	1	2	Ped: 1113	Per: 22
1113	23	0	0	38	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	Ped: 1113	Per: 23
1113	24	9	10	0	25	25	1	0	2	3	2	2	2	3	3	Ped: 1113	Per: 24
1113	25	9	10	0	26	26	1	0	2	3	3	1	2	1	2	Ped: 1113	Per: 25
1113	26	9	10	0	0	0	2	0	1	3	4	1	3	2	3	Ped: 1113	Per: 26
1113	27	13	12	0	28	28	1	0	1	3	4	2	3	3	3	Ped: 1113	Per: 27
1113	28	13	12	0	29	29	2	0	2	3	3	2	2	3	3	Ped: 1113	Per: 28
1113	29	13	12	0	0	0	2	0	1	4	3	2	3	3	3	Ped: 1113	Per: 29
1113	30	16	15	0	31	31	1	0	2	3	4	1	1	2	3	Ped: 1113	Per: 30
1113	31	16	15	0	0	0	2	0	1	4	2	1	1	2	3	Ped: 1113	Per: 31
1113	32	18	17	0	33	33	2	0	2	3	2	2	2	1	3	Ped: 1113	Per: 32
1113	33	18	17	0	0	0	1	0	2	2	3	2	2	1	2	Ped: 1113	Per: 33
1113	34	20	19	0	35	35	1	0	2	1	3	2	3	1	3	Ped: 1113	Per: 34
1113	35	20	19	0	36	36	2	0	2	3	2	2	3	1	3	Ped: 1113	Per: 35
1113	36	20	19	0	37	37	1	0	2	4	2	1	3	2	3	Ped: 1113	Per: 36
1113	37	20	19	0	0	0	2	0	1	1	4	1	3	2	3	Ped: 1113	Per: 37
1113	38	23	22	0	39	39	2	0	1	1	4	1	3	2	3	Ped: 1113	Per: 38
1113	39	23	22	0	40	40	1	0	1	1	4	1	3	2	3	Ped: 1113	Per: 39
1113	40	23	22	0	0	0	2	0	2	1	3	2	2	1	3	Ped: 1113	Per: 40

图 1.4.9　根据家系 1113（图 1.4.3）编写的例 2 的家系文件。

区别。按 Page Down 到下一屏。

3. 第 6 屏是 Map Specification 屏，用来指定分析的特性。

```
line 1    4 0 0 5  << NO. OF LOCI, RISK LOCUS, SEXLINKED (IF 1) PROGRAM
line 2    0 0.0 0.0 0 << MUT LOCUS, MUT MALE, MUT FEM, HAP FREQ (IF 1)
line 3    1  2 3 4
line 4    1   2  << AFFECTION, NO. OF ALLELES
line 5    0.990000 0.010000   << GENE FREQUENCIES
line 6    1 << NO. OF LIABILITY CLASSES
line 7    0 0.80 0.80 << PENETRANCES
line 8    3   4  << ALLELE NUMBERS, NO. OF ALLELES
line 9    0.30 0.30 0.05 0.35
line 10   3   3
line 11   0.40 0.10 0.50
line 12   3   3
line 13   0.05 0.40 0.55
line 14   0 0  << SEX DIFFERENCE, INTERFERENCE (IF 1 OR 2)
line 15   0.5 0.03 0.05 << RECOMBINATION VALUES
line 16   1 0.0 10 << LOCUS VARIED, FINISHING VALUE, NO. OF EVALUATIONS
```

图 1.4.10 例 2 区间 0 的参数文件。

在 Test Loci 选项键入 1 表示位点 1 是疾病位点，在分析中它将在固定图谱中的不同位置移动。

在 Order of Fixed Loci 选项键入 2 3 4 表示图谱中标记的顺序为标记 2—标记 3—标记 4。

在 Recombination Fraction 选项键入 0.03 0.05 表示标记 2 和 3 之间的重组分数为 0.03，标记 3 和 4 之间的重组分数为 0.05。注意键入数值的顺序必须与 Order of Fixed Loci 选项中的相附和。

在 Test Interval 选项键入 0 表示在第一次分析时，测试位点 1 应该放在区间 0（临近标记 2）。关于区间的设置见图 1.4.1。

在 Number of Evaluations in Interval 选项键入 10 命令程序在测试位点与标记 2 之间将最大允许重组率平均分成 10 份计算 LOD 值。在区间 0，测试位点与标记 2 之间允许的最大重组率是 50%（在 50%时，疾病位点与该系列位点不连锁），因此 LOD 值将在 θ=0.50、0.45、0.40、0.35、…、0 时计算。

以上是四个必须分析的第一步，其他的三个分析应该在区间 1、2、3 分别进行。

4. 继续在 Map Specification 屏键入其他的分析。修改 Test Interval 和 Number of Evaluations in Interval；其他选项类似（使用光标的 Up 和 Down 在选项间移动）。

分析区间 1 时，修改 Test Interval 为 1，Number of Evaluations in Interval 为 3，按 Page Down 运行分析。

分析区间 2 时，修改 Test Interval 为 2，Number of Evaluations in Interval 为 5，按 Page Down 运行分析。

分析区间 3 时，修改 Test Interval 为 3，Number of Evaluations in Interval 为 10，按 Page Down 运行分析。

5. 按 Ctrl+Z 退出 LCP。

如果使用者遇见错误信息提示，**ERROR：Range check error，程序常量中至少一个太小。问题的大小超出了 LINKMAP 允许的执行的常量的大小，需要重新编译程序。

重新编译程序

6. 修改 LINKMAP 程序的常量适应研究的问题。最常修改的程序常量如下。

Maxlous 是指研究中最大的位点数。本例中，最大的位点数是 4。

Maxall 是指任何位点的最大等位基因数。本例中，最大等位基因数是 4。

Maxhap 是多个位点的最大单体型数。最大单体型数是各个位点的等位基因数之积。本例中，最大单体型数为 2×4×3×3=72。

Maxind 是分析中最大个体数，等于各个家系的个体数之和。本例中，最大个体数为 40。

Maxped 是研究中最大的家系数。本例中，最大的家系数为 1。

Maxchild 是研究时同胞中最大的全同胞数。本例中，最大的全同胞数为 4。

Maxloop 是研究时任意单个家系中最大的环的数目。本例中，最大环的数目为 0。

进行分析

7. 现在 LINKMAP 已经被重新编译以适合研究的需要，键入 pedin 开始分析。

计算多点 LOD 值

上述分析的输出结果被保存在一个名为 final. out 的文件中，图 1.4.11 显示了部分结果。多点 LOD 值可以根据此输出文件人工计算。

例如，要计算疾病基因在标记 2 的附近，并与这一系列标记的重组分数为 40%时的多点 LOD 值时，根据图 1.4.11 中的加粗斜体字，多点 LOD 值结果为：(−58.890 26)−(−60.274 12)=1.383 926。−60.274 12 是疾病基因与这一系列标记不连锁的似然性的常用对数值，是计算多点似然率时的分母，−58.890 26 是疾病基因与这一系列标记有 40%重组时似然性的常用对数值，是计算多点似然率时的分子。因为这些值已经被转换成常用对数，所以可以直接相减得到 LOD 值。这个计算也可以通过如下分析来完成。

8. 使用 LINKLODS 程序完成上述减法运算。键入 linklods 激活程序。
9. 程序将提示输入文件名称。在采用 LCP 生成的批处理文件执行 MLINK 或者 LINKMAP 分析后，适当的输入文件是 final. out。当如例 1 中直接运行 MLINK 或者 LINKMAP 分析后，适当的输入文件是 outfile. dat。LINKLODS 输出文件名为 final. lod，详见图 1.4.12～图 1.4.15。

图表结果

10. LINKLODS 也能提供重组分数到遗传距离（用 morgans 表示）之间的换算，并假设干涉在 Haldlane 水平（图 1.4.12～图 1.4.15）。为了评估疾病基因在已知图谱的位置，绘制的曲线图结果如图 1.4.16 所示，纵轴表示多点 LOD，横轴表示遗传距离。

```
*************************************************************************
                          LINKMAP
     Pedigree File                 : multi.TPD
     Parameter File                : multi.TDT
     Output Pedigree File          : PEDFILE.DAT
     Output Parameter File         : DATAFILE.DAT
     Log File                      : LSP.LOG
     Stream File                   : LSP.STM

     Date Run                      :  5-Aug-94   23:00:06

     Sex Difference                : 0
     Test Locus                    : 1
     Stop Value                    : 0.00000000
     Number of Evaluations         : 10

     Locus Order                   : 1 2 3 4
     Male Recomb. Fractions        : 0.50000000 0.03000000 0.05000000
*************************************************************************

Length of real variables = 8 bytes
-----------------------------------
-----------------------------------
THETAS  0.500 0.030 0.050
-----------------------------------
PEDIGREE |  LN LIKE   | LOG 10 LIKE
-----------------------------------
     1113  -138.786797   -60.274212
-----------------------------------
TOTALS     -138.786797   -60.274212
-2 LN(LIKE) =  2.77573594548582E+0002
-----------------------------------
-----------------------------------
THETAS  0.450 0.030 0.050
-----------------------------------
PEDIGREE |  LN LIKE   | LOG 10 LIKE
-----------------------------------
     1113  -137.316975   -59.635878
-----------------------------------
TOTALS     -137.316975   -59.635878
-2 LN(LIKE) =  2.74633950514413E+0002
-----------------------------------
-----------------------------------
THETAS  0.400 0.030 0.050
-----------------------------------
PEDIGREE |  LN LIKE   | LOG 10 LIKE
-----------------------------------
     1113  -135.600183   -58.890286
-----------------------------------
TOTALS     -135.600183   -58.890286
-2 LN(LIKE) =  2.71200365186978E+0002
-----------------------------------
-----------------------------------
THETAS  0.350 0.030 0.050
-----------------------------------
PEDIGREE |  LN LIKE   | LOG 10 LIKE
-----------------------------------
     1113  -133.878195   -58.142437
-----------------------------------
TOTALS     -133.878195   -58.142437
-2 LN(LIKE) =  2.67756389466871E+0002
-----------------------------------
-----------------------------------
THETAS  0.300 0.030 0.050
-----------------------------------
PEDIGREE |  LN LIKE   | LOG 10 LIKE
-----------------------------------
     1113  -132.241780   -57.431753
-----------------------------------
TOTALS     -132.241780   -57.431753
-2 LN(LIKE) =  2.64483560117904E+0002
-----------------------------------
-----------------------------------
THETAS  0.250 0.030 0.050
-----------------------------------
PEDIGREE |  LN LIKE   | LOG 10 LIKE
-----------------------------------
     1113  -130.716504   -56.769335
-----------------------------------
TOTALS     -130.716504   -56.769335
-2 LN(LIKE) =  2.61433008316186E+0002
-----------------------------------

-----------------------------------
THETAS  0.200 0.030 0.050
-----------------------------------
PEDIGREE |  LN LIKE   | LOG 10 LIKE
-----------------------------------
     1113  -129.315676   -56.160965
-----------------------------------
TOTALS     -129.315676   -56.160965
-2 LN(LIKE) =  2.58631352404433E+0002
-----------------------------------
-----------------------------------
THETAS  0.150 0.030 0.050
-----------------------------------
PEDIGREE |  LN LIKE   | LOG 10 LIKE
-----------------------------------
     1113  -128.058911   -55.615160
-----------------------------------
TOTALS     -128.058911   -55.615160
-2 LN(LIKE) =  2.56117822981292E+0002
-----------------------------------
-----------------------------------
THETAS  0.100 0.030 0.050
-----------------------------------
PEDIGREE |  LN LIKE   | LOG 10 LIKE
-----------------------------------
     1113  -126.992632   -55.152082
-----------------------------------
TOTALS     -126.992632   -55.152082
-2 LN(LIKE) =  2.53985263822361E+0002
-----------------------------------
-----------------------------------
THETAS  0.050 0.030 0.050
-----------------------------------
PEDIGREE |  LN LIKE   | LOG 10 LIKE
-----------------------------------
     1113  -126.271595   -54.838940
-----------------------------------
TOTALS     -126.271595   -54.838940
-2 LN(LIKE) =  2.52543189780585E+0002
-----------------------------------
-----------------------------------
THETAS  0.000 0.030 0.050
-----------------------------------
PEDIGREE |  LN LIKE   | LOG 10 LIKE
-----------------------------------
     1113  -128.172680   -55.664569
-----------------------------------
TOTALS     -128.172680   -55.664569
-2 LN(LIKE) =  2.56345360523932E+0002
-----------------------------------
```

Additional data eliminated for brevity.
Data appear on screen as a single column.

图 1.4.11　例 2 的部分分析结果。

```
Program LINKMAP
Locus Order:  1 2 3 4
NEW BASELINE LIKELIHOODS USED FOR THE FOLLOWING LOD SCORES

THETAS  0.450  0.030  0.050
Male map position:   -1.1513 (Haldane)   -0.7361 (Kosambi)
     PED         LOD
    1113       0.638
  TOTALS       0.638

THETAS  0.400  0.030  0.050
Male map position:   -0.8047 (Haldane)   -0.5493 (Kosambi)
     PED         LOD
    1113       1.384
  TOTALS       1.384

THETAS  0.350  0.030  0.050
Male map position:   -0.6020 (Haldane)   -0.4337 (Kosambi)
     PED         LOD
    1113       2.132
  TOTALS       2.132

THETAS  0.300  0.030  0.050
Male map position:   -0.4581 (Haldane)   -0.3466 (Kosambi)
     PED         LOD
    1113       2.842
  TOTALS       2.842

THETAS  0.250  0.030  0.050
Male map position:   -0.3466 (Haldane)   -0.2747 (Kosambi)
     PED         LOD
    1113       3.505
  TOTALS       3.505

THETAS  0.200  0.030  0.050
Male map position:   -0.2554 (Haldane)   -0.2118 (Kosambi)
     PED         LOD
    1113       4.113
  TOTALS       4.113

THETAS  0.150  0.030  0.050
Male map position:   -0.1783 (Haldane)   -0.1548 (Kosambi)
     PED         LOD
    1113       4.659
  TOTALS       4.659

THETAS  0.100  0.030  0.050
Male map position:   -0.1116 (Haldane)   -0.1014 (Kosambi)
     PED         LOD
    1113       5.122
  TOTALS       5.122

THETAS  0.050  0.030  0.050
Male map position:   -0.0527 (Haldane)   -0.0502 (Kosambi)
     PED         LOD
    1113       5.435
  TOTALS       5.435

THETAS  0.000  0.030  0.050
Male map position:    0.0000 (Haldane)    0.0000 (Kosambi)
     PED         LOD
    1113       4.610
  TOTALS       4.610
```

图 1.4.12　例 2 LINKLODS 输出结果，位点顺序为 1 2 3 4。

```
Program LINKMAP
Locus Order:  2 1 3 4
THETAS  0.000  0.030  0.050
Male map position:    0.0000 (Haldane)    0.0000 (Kosambi)
     PED          LOD
    1113        4.610
  TOTALS        4.610

THETAS  0.010  0.020  0.050
Male map position:    0.0101 (Haldane)    0.0100 (Kosambi)
     PED          LOD
    1113        4.472
  TOTALS        4.472

THETAS  0.020  0.010  0.050
Male map position:    0.0204 (Haldane)    0.0200 (Kosambi)
     PED          LOD
    1113        4.171
  TOTALS        4.171

THETAS  0.030  0.000  0.050
Male map position:    0.0309 (Haldane)    0.0300 (Kosambi)
     PED          LOD
    1113        1.446
  TOTALS        1.446
```

图 1.4.13 例 2 LINKLODS 输出结果，位点顺序为 2 1 3 4。

```
Program LINKMAP
Locus Order:  2 3 1 4
THETAS  0.030  0.000  0.050
Male map position:    0.0309 (Haldane)    0.0300 (Kosambi)
     PED          LOD
    1113        1.446
  TOTALS        1.446

THETAS  0.030  0.010  0.041
Male map position:    0.0410 (Haldane)    0.0400 (Kosambi)
     PED          LOD
    1113        1.552
  TOTALS        1.552

THETAS  0.030  0.020  0.031
Male map position:    0.0513 (Haldane)    0.0500 (Kosambi)
     PED          LOD
    1113        1.428
  TOTALS        1.428

THETAS  0.030  0.030  0.021
Male map position:    0.0619 (Haldane)    0.0601 (Kosambi)
     PED          LOD
    1113        1.093
  TOTALS        1.093

THETAS  0.030  0.040  0.011
Male map position:    0.0726 (Haldane)    0.0701 (Kosambi)
     PED          LOD
    1113        0.403
  TOTALS        0.403

THETAS  0.030  0.050  0.000
Male map position:    0.0836 (Haldane)    0.0802 (Kosambi)
     PED          LOD
    1113       -3.240
  TOTALS       -3.240
```

图 1.4.14 例 2 LINKLODS 输出结果，位点顺序为 2 3 1 4。

```
Program LINKMAP
Locus Order:  2 3 4 1

THETAS  0.030  0.050  0.000
Male map position:    0.0836 (Haldane)    0.0802 (Kosambi)
      PED       LOD
     1113     -3.240
   TOTALS     -3.240

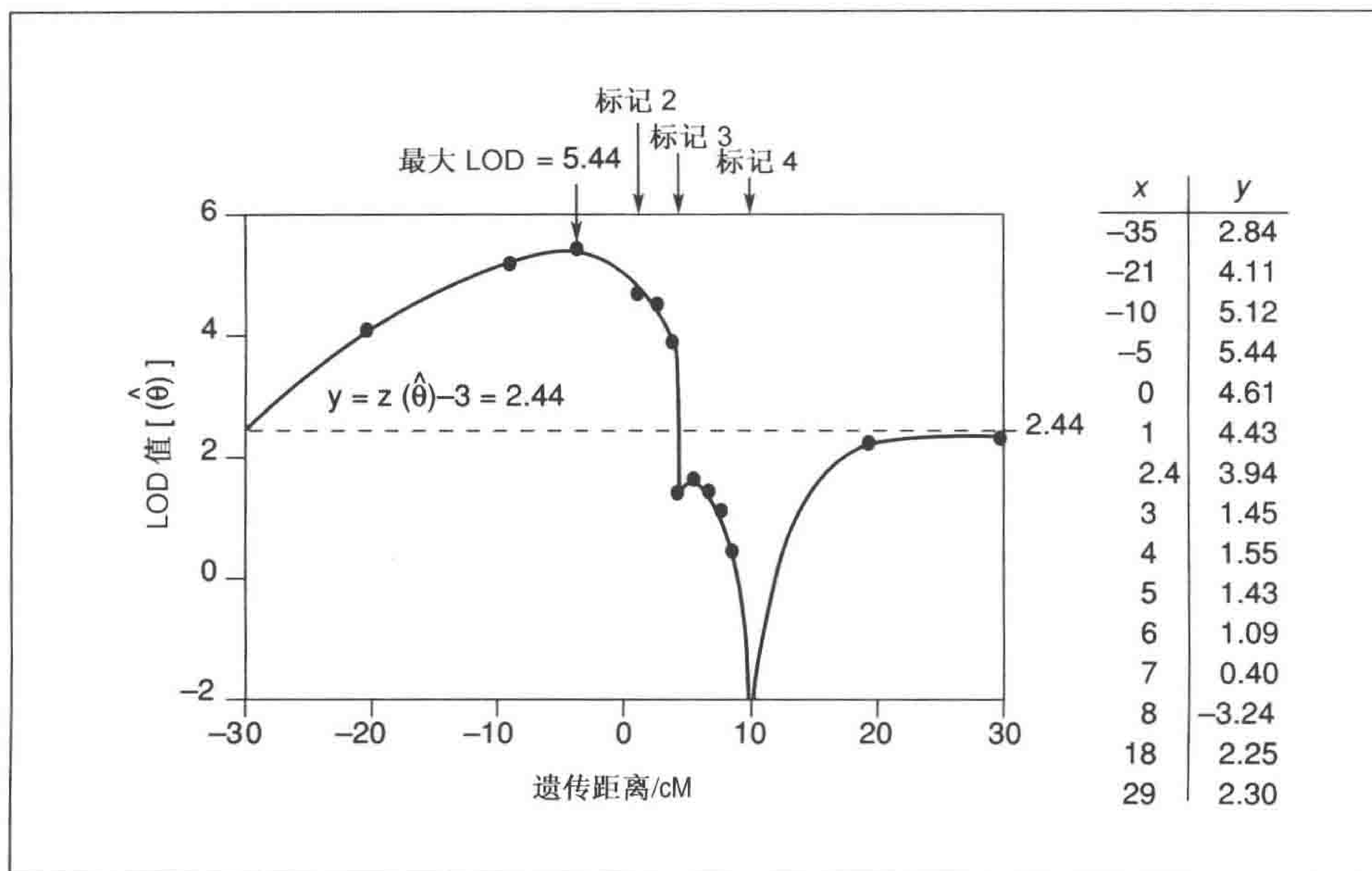
THETAS  0.030  0.050  0.100
Male map position:    0.1952 (Haldane)    0.1816 (Kosambi)
      PED       LOD
     1113      2.253
   TOTALS      2.253

THETAS  0.030  0.050  0.200
Male map position:    0.3390 (Haldane)    0.2920 (Kosambi)
      PED       LOD
     1113      2.297
   TOTALS      2.297

THETAS  0.030  0.050  0.300
Male map position:    0.5418 (Haldane)    0.4268 (Kosambi)
      PED       LOD
     1113      1.730
   TOTALS      1.730

THETAS  0.030  0.050  0.400
Male map position:    0.8883 (Haldane)    0.6295 (Kosambi)
      PED       LOD
     1113      0.851
   TOTALS      0.851
```

图 1.4.15　例 2 LINKLODS 输出结果，位点顺序为 2 3 4 1。



x	y
−35	2.84
−21	4.11
−10	5.12
−5	5.44
0	4.61
1	4.43
2.4	3.94
3	1.45
4	1.55
5	1.43
6	1.09
7	0.40
8	−3.24
18	2.25
29	2.30

图 1.4.16　例 2 多点 LOD 图，横轴表示遗传距离（cM），纵轴表示多点 LOD。数据来自图 1.4.12～图 1.4.15，遗传距离据 Kosambi。横穿曲线的水平线对应于 $y=z(\hat{\theta})-3$，来构建疾病基因是 1000∶1 可能性的区间。箭头表示标记 1 和其他标记重组分数（θ）为 0 时的多点 LOD 值。

由于LINKAGE需要输入位点间的重组分数而不是遗传距离，对两种度量单位进行精确换算是很重要的。换算根据研究者假定的干涉程度而定，常假设没有干涉(Haldlane)或一定水平的干涉，如Sturt作图函数假设短距离内完全的干涉，随着距离增加干涉水平下降。MAPFUN程序提供重组分数和遗传距离(cM)之间的换算。

把重组分数转换成遗传距离（一种备选方式）

11. 激活MAPFUN，表明是遗传距离根据给定的θ计算（相应的M）或者θ值根据给定遗传距离来计算（相应的T）。根据图谱，相应的值被提供。在本例中，干涉被假定在Haldane水平。

    假定干涉在Haldane水平，MAPFUN将重组分数0.03和0.05分别转换成3.09cM和5.27cM。随着遗传距离的增加，重组分数与遗传距离的差别将变得更加明显。虽然LINKLODS可自动将重组分数转换成遗传距离，在有些分析中也可能是根据遗传图谱中标记之间的距离用morgans或cM来计算的。LINKAGE程序需要输入重组分数；MAPFUN能执行重组分数与遗传距离之间的转换。

结果分析

12. 确定疾病基因可能位置的支持区间。用最大LOD值减去3.0，找到相关θ值；在纵轴上最大LOD值减去3.0的位置画一条横穿曲线的水平线。在水平线上方的所有的点都包括在3个lod单位的支持区间内，进一步的研究不能排除此区间；也就是说，需要提供更多的证据来证明疾病基因位于此区间内。
13. 根据曲线分析疾病基因的位置。本例中，在标记2的附近得到最高LOD值，此时疾病位点与这一系列标记的重组率为5%，最大LOD值为5.44。第二高的LOD值为4.54，出现在标记2和3区间的侧翼。图1.4.16分析如下：最可能的疾病基因位置在标记2附近5cM内。疾病基因位于此区间的可能性与疾病基因位于标记2和3之间的第二可能位置的概率比是7.94∶1。这个概率是根据最大LOD值与第二大LOD值的差的反对数计算得到的。本例中，差值为5.44－4.54＝0.90，疾病基因在标记2附近的优势为$10^{0.90}$∶1＝7.94。同时，标记3的远端不包括在3个lod单位的支持区间内，不是疾病基因的区间。
14. 确定是否有必要选其他标记进行基因分型。本例中，最大LOD值在遗传图谱之外，因此建议考虑选用标记2附近的其他标记在家系进行基因分型，进一步精确定位疾病基因区间的位置。

例3 外显率与年龄有关的常染色体显性遗传疾病的两点连锁分析

这个例子演示了在连锁分析中怎样将年龄依赖性的外显率和易患性分类结合起来。如果可以利用受累个体最初发病年龄(age-of-onset，AO)的信息，它能被用来估计外显率。外显率估计越真实，分析结果越可靠。然而，发病年龄的真实信息经常是未知的，必须靠估计。通常研究人员假设外显率一致或随着年龄线性增长。而实际上，只要外显率接近于已有的数据，那么外显率函数的准确性对分析得出的结论可能影响甚微。

在本例中，描述了一种尚在发展中的简单的处理方法：AO 曲线，这种曲线可与连锁分析一起应用。值得注意的是这种方法仅仅适合于不存在拟表型且患者的最初发病年龄已知时。本例使用了图 1.4.3 中的 1113 家系 15 个受累个体的最初发病年龄数据，10 个不同个体的检查的数据。最初发病年龄的范围为 17～55 岁，跨度 38 年，如图 1.4.17 所示。

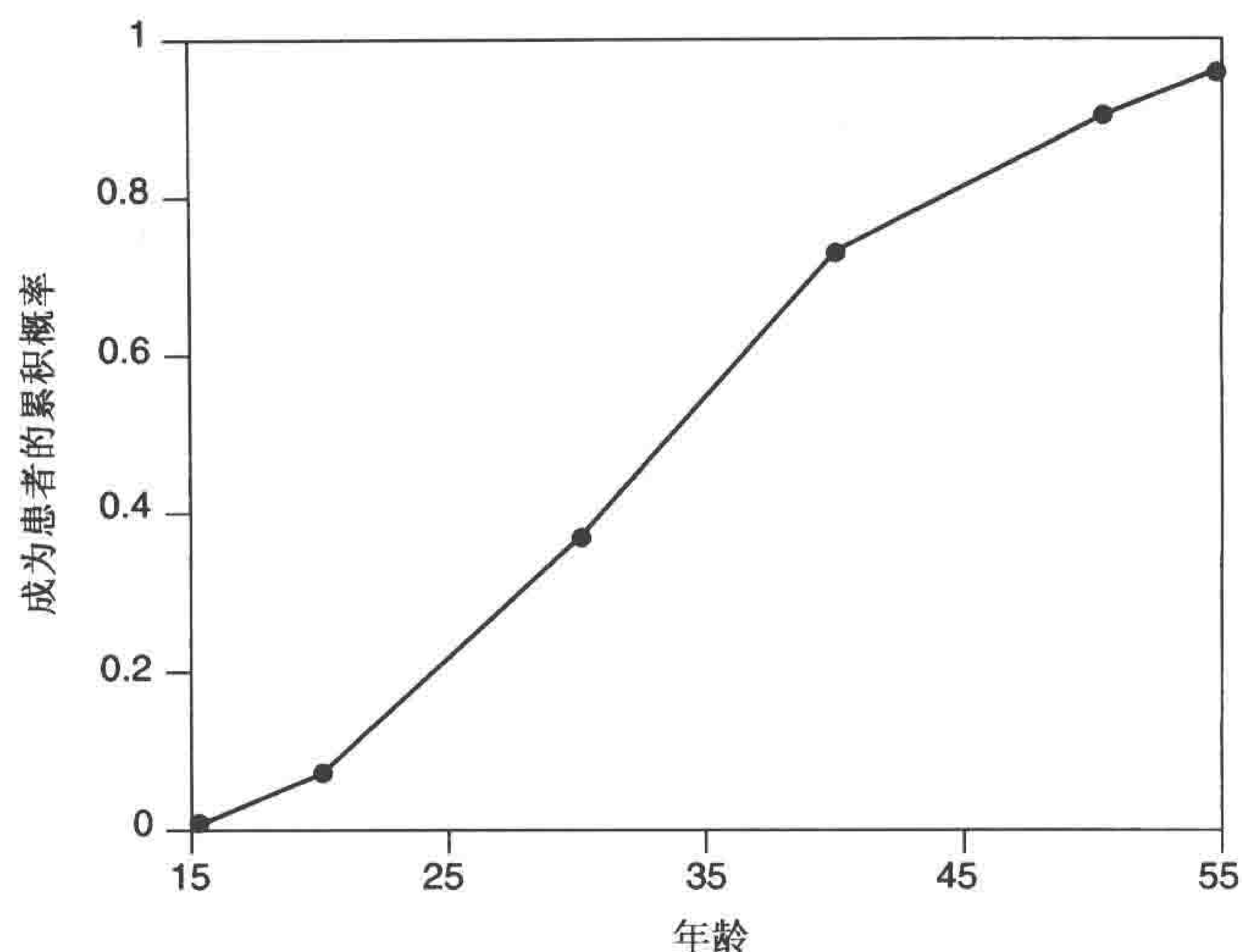


图 1.4.17 例 3 中最初发病年龄与携带致病基因的个体变成患者的累积概率函数，横轴表示年龄，纵轴表示携带致病基因的个体在每一年龄段变成患者的累积概率。

1. 确定易患性类别。本例根据年龄范围，数据可分成 6 个区间。实际上，到底分成几个易患性群体可由研究者自己决定。对于不同易患性群体的外显率的确定过程见表 1.4.4。尽管在目前的数据中没有一个个体小于 17 岁，但对于将来的家系成员，把 17 岁以下分成一类是有必要的。

表 1.4.4 计算与发病年龄有关的外显率

易患性分类	年龄段/岁	本年龄段变成患者的个体数	本年龄段变成患者的概率	变成患者的累积概率	本年龄段的外显率
1	0～14	0	0.0	0.0	0.0
2	15～24	2	2/15=0.133	0.133	0.066
3	25～34	7	7/15=0.466	0.599	0.366
4	35～44	4	4/15=0.266	0.865	0.732
5	45～54	1	1/15=0.066	0.931	0.898
6	>—54	1	1/15=0.066	0.997	0.964

2. 记录在每个年龄段变成患者的个体数目（表 1.4.4 第 3 栏）。
3. 计算每一年龄段携带致病基因的个体变成患者的概率（用在这一年龄段变成患者的个体数目除以总的已知最初发病年龄患者数目，表 1.4.4 第 4 栏）。
4. 计算每一年龄段携带致病基因的个体变成患者的累积概率（本年龄段的概率与本年龄段之前所有年龄段的概率之和；表 1.4.4 第 5 栏）。

家系编号	个体编号	父系编号	母系编号	第一后代	紧随父系同胞	紧随母系同胞	性别	先证者	受累状态	易感性分类	等位基因1	等位基因2				
1113	1	0	0	4	0	0	1	1	2	7	0	0	Ped:	1113	Per:	1
1113	2	0	0	4	0	0	2	0	1	7	0	0	Ped:	1113	Per:	2
1113	3	0	0	10	0	0	2	0	1	7	0	0	Ped:	1113	Per:	3
1113	4	1	2	10	5	5	1	0	2	5	1	2	Ped:	1113	Per:	4
1113	5	1	2	14	7	7	2	0	2	7	0	0	Ped:	1113	Per:	5
1113	6	0	0	14	0	0	1	0	1	7	0	0	Ped:	1113	Per:	6
1113	7	1	2	20	0	0	2	0	2	7	0	0	Ped:	1113	Per:	7
1113	8	0	0	20	0	0	1	0	1	7	0	0	Ped:	1113	Per:	8
1113	9	0	0	24	0	0	1	0	1	7	0	0	Ped:	1113	Per:	9
1113	10	4	3	24	11	11	2	0	2	4	2	3	Ped:	1113	Per:	10
1113	11	4	3	0	12	12	2	0	1	6	1	3	Ped:	1113	Per:	11
1113	12	4	3	27	0	0	2	0	2	7	0	0	Ped:	1113	Per:	12
1113	13	0	0	27	0	0	1	0	1	7	2	2	Ped:	1113	Per:	13
1113	14	6	5	0	16	16	1	0	1	4	1	1	Ped:	1113	Per:	14
1113	15	0	0	30	0	0	2	0	1	7	1	1	Ped:	1113	Per:	15
1113	16	6	5	30	17	17	1	0	2	3	1	2	Ped:	1113	Per:	16
1113	17	6	5	32	0	0	2	0	2	4	1	2	Ped:	1113	Per:	17
1113	18	0	0	32	0	0	1	0	1	7	2	2	Ped:	1113	Per:	18
1113	19	0	0	34	0	0	2	0	1	7	3	3	Ped:	1113	Per:	19
1113	20	8	7	34	21	21	1	0	2	7	0	0	Ped:	1113	Per:	20
1113	21	8	7	0	22	22	2	0	1	6	1	1	Ped:	1113	Per:	21
1113	22	8	7	38	0	0	2	0	2	6	1	2	Ped:	1113	Per:	22
1113	23	0	0	38	0	0	1	0	1	7	0	0	Ped:	1113	Per:	23
1113	24	9	10	0	25	25	1	0	2	3	2	2	Ped:	1113	Per:	24
1113	25	9	10	0	26	26	1	0	2	3	1	2	Ped:	1113	Per:	25
1113	26	9	10	0	0	0	2	0	1	3	1	3	Ped:	1113	Per:	26
1113	27	13	12	0	28	28	1	0	1	3	2	3	Ped:	1113	Per:	27
1113	28	13	12	0	29	29	2	0	2	3	2	2	Ped:	1113	Per:	28
1113	29	13	12	0	0	0	2	0	1	3	2	3	Ped:	1113	Per:	29
1113	30	16	15	0	31	31	1	0	2	3	1	1	Ped:	1113	Per:	30
1113	31	16	15	0	0	0	2	0	1	3	1	1	Ped:	1113	Per:	31
1113	32	18	17	0	33	33	2	0	2	2	2	2	Ped:	1113	Per:	32
1113	33	18	17	0	0	0	1	0	2	2	2	2	Ped:	1113	Per:	33
1113	34	20	19	0	35	35	1	0	2	3	2	3	Ped:	1113	Per:	34
1113	35	20	19	0	36	36	2	0	2	4	2	3	Ped:	1113	Per:	35
1113	36	20	19	0	37	37	1	0	2	3	1	3	Ped:	1113	Per:	36
1113	37	20	19	0	0	0	2	0	1	4	1	3	Ped:	1113	Per:	37
1113	38	23	22	0	39	39	2	0	1	2	1	3	Ped:	1113	Per:	38
1113	39	23	22	0	40	40	1	0	1	3	1	3	Ped:	1113	Per:	39
1113	40	23	22	0	0	0	2	0	2	4	2	2	Ped:	1113	Per:	40

图 1.4.18 根据家系 1113（见图 1.4.3）编写的例 3 的家系文件（example3. ped）。

5. 计算连锁分析时参数文件中每个易患性群体中易感基因型的实际输入外显率（在每个年龄段中点时，曲线的平均高度；表 1.4.4 第 6 栏）。第 i 区间的外显率为第 $i-1$ 区间变成患者的累积概率与第 i 区间变成患者的累积概率之和的一半。比如第三类易患人群的外显率为：(0.133＋0.599)/2＝0.366。
6. 修改家系文件，使其包含易患性分类的信息。修改后的 example3. ped 文件，如图 1.4.18 所示。
7. 修改参数文件，使其适合易患性分类的连锁分析。用 PREPLINK 程序，在把位点 1 变成受累状态位点后添加易患人群分类数目及相应的外显率：

选定 a 修改位点；
选择要修改的位点是位点 1；
选择 b 将易患人群类别数目改为 7；
选择 c，根据程序提示输入每个易患人群的外显率；
继续按需要准备参数文件。

本例的参数文件（example3. dat）如图 1.4.19 所示。

```
line 1   2 0 0 5  << NO. OF LOCI, RISK LOCUS, SEXLINKED (IF 1) PROGRAM
line 2   0 0.0 0.0 0 << MUT LOCUS, MUT MALE, MUT FEM, HAP FREQ (IF 1)
line 3   1  2
line 4   1   2  << AFFECTION, NO. OF ALLELES
line 5   0.990000 0.010000   << GENE FREQUENCIES
line 6   7 << NO. OF LIABILITY CLASSES
line 7   0.0 0.000 0.000  << PENETRANCES (* LIABILITY CLASS 1 *)
line 8   0.0 0.066 0.066  << PENETRANCES (* LIABILITY CLASS 2 *)
line 9   0.0 0.366 0.366  << PENETRANCES (* LIABILITY CLASS 3 *)
line 10  0.0 0.732 0.732  << PENETRANCES (* LIABILITY CLASS 4 *)
line 11  0.0 0.898 0.898  << PENETRANCES (* LIABILITY CLASS 5 *)
line 12  0.0 0.964 0.964  << PENETRANCES (* LIABILITY CLASS 6 *)
line 13  0.0 1.000 1.000  << PENETRANCES (* LIABILITY CLASS 7 *)
line 14  3   3  << ALLELE NUMBERS, NO. OF ALLELES
line 15  0.40 0.10 0.50
line 16  0 0  << SEX DIFFERENCE, INTERFERENCE (IF 1 OR 2)
line 17  0.0 << RECOMBINATION VALUES
line 18  1 0.001 0.001 << REC VARIED, INCREMENT, FINISHING VALUE
line 19  0.05 0.05 0.15
line 20  0.20 0.10 0.40
```

图 1.4.19　例 3 的参数文件（example3. dat）。

8. 按其他例题方式进行两点连锁分析。

例 4　X 染色体连锁隐性遗传疾病的两点连锁分析

在本例中，MLINK 程序被用来分析 X 染色体连锁隐性遗传病，并特别提及在受累状态位点进行易患人群分类与常染色体的差别。图 1.4.20 显示一个 X 染色体连锁隐性

遗传病家系，有 100％的外显率和 0.0001 的致病基因频率。在标记 X1，已经对这个家系进行了基因分型，共有 3 个等位基因，等位基因 1、2、3 的频率分别为 0.33、0.33 和 0.34。每个个体的基因型在家系成员符号的下方，圆圈中心有一个点表示女性携带者。家系文件（example4.ped）如图 1.4.21 所示。

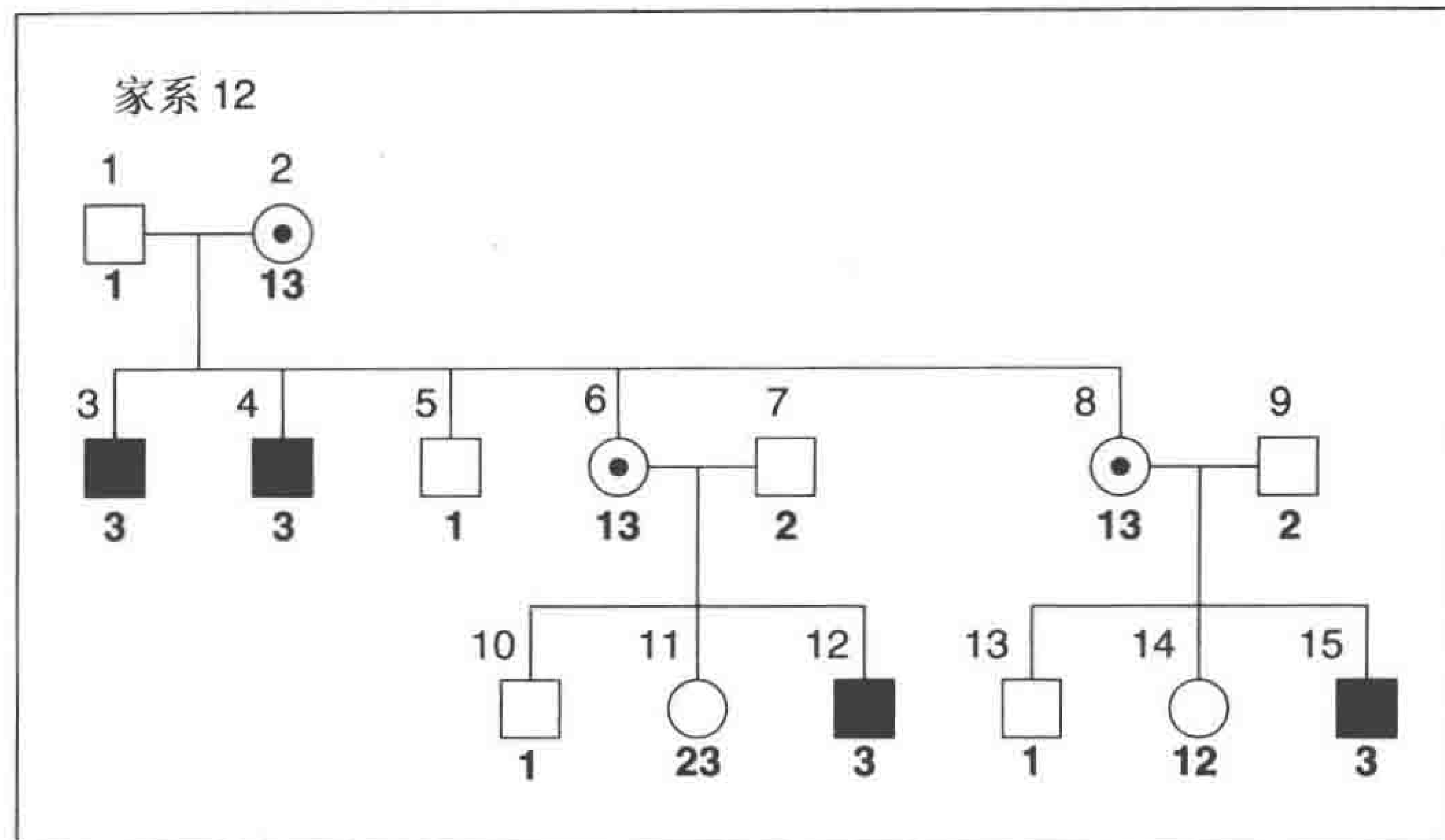


图 1.4.20　例 4 的家系图，圆圈中心有一点表示女性携带者。

家系编号	个体编号	父系编号	母系编号	第一后代	紧随父系同胞	紧随母系同胞	性别	先证者	受累状态	等位基因1	等位基因2		
1	1	0	0	3	0	0	1	1	1	1	1	Ped: 1	Per: 1
1	2	0	0	3	0	0	2	0	1	1	3	Ped: 1	Per: 2
1	3	1	2	0	4	4	1	0	2	3	3	Ped: 1	Per: 3
1	4	1	2	0	5	5	1	0	2	3	3	Ped: 1	Per: 4
1	5	1	2	0	6	6	1	0	1	1	1	Ped: 1	Per: 5
1	6	1	2	10	8	8	2	0	1	1	3	Ped: 1	Per: 6
1	7	0	0	10	0	0	1	0	1	2	2	Ped: 1	Per: 7
1	8	1	2	13	0	0	2	0	1	1	3	Ped: 1	Per: 8
1	9	0	0	13	0	0	1	0	1	2	2	Ped: 1	Per: 9
1	10	7	6	0	11	11	1	0	1	1	1	Ped: 1	Per: 10
1	11	7	6	0	12	12	2	0	1	2	3	Ped: 1	Per: 11
1	12	7	6	0	0	0	1	0	2	3	3	Ped: 1	Per: 12
1	13	9	8	0	14	14	1	0	1	1	1	Ped: 1	Per: 13
1	14	9	8	0	15	15	2	0	1	1	2	Ped: 1	Per: 14
1	15	9	8	0	0	0	1	0	2	3	3	Ped: 1	Per: 15

图 1.4.21　例 4 的家系文件（example4.ped）。

在易患人群分类时，女性被编码为 1，因为虽然她们是携带者，但不会患病。注意家系文件中的男性，虽然在这个位点他们是半合子，仅仅一个等位基因，家系文件还是列出了两个等位基因。例如，个体 4 遗传了来自母亲的等位基因 3，为了 LINKAGE 程序的需要，还是把他作为纯合子 3 3。

PREPLINK 准备的参数文件（example4.dat）如图 1.4.22 所示。注意易患性分

类。因为是X染色体连锁，易患性分类时外显率分成两行，但是易患性类别仍是1。外显率的第1行是女性的外显率，第2行是男性的外显率。第1行有3个值，因为女性有正常等位基因纯合子、杂合子和疾病等位基因纯合子。男性仅有两个外显率，因为只有两种可能的基因型：正常等位基因半合子或者疾病等位基因半合子。同时注意参数文件第13行，提示程序计算LOD值仅仅在 $\theta=0.0$、0.10、0.20、0.30和0.40。这是PREPLINK的默认指定，可以根据研究者的指定进行更改。

```
line 1    2 0 1 5  << NO. OF LOCI, RISK LOCUS, SEXLINKED (IF 1) PROGRAM
line 2    0 0.0 0.0 0 << MUT LOCUS, MUT MALE, MUT FEM, HAP FREQ (IF 1)
line 3    1  2
line 4    1   2  << AFFECTION, NO. OF ALLELES
line 5    9.9990000000E-01 1.0000000000E-04  << GENE FREQUENCIES
line 6    1 << NO. OF LIABILITY CLASSES
line 7    0 0 1.0000
line 8    0 1.0000 << PENETRANCES
line 9    3   3  << ALLELE NUMBERS, NO. OF ALLELES
line 10   0.330000 0.330000 0.340000  << GENE FREQUENCIES
line 11   0 0  << SEX DIFFERENCE, INTERFERENCE (IF 1 OR 2)
line 12   0.000 << RECOMBINATION VALUES
line 13   1 0.10000 0.45000 << REC VARIED, INCREMENT, FINISHING VALUE
```

图1.4.22　例4的参数文件（example4.dat）。

两点连锁分析的结果见表1.4.5。因为是X染色体连锁疾病，性状与位点之间连锁的前概率要高于常染色体的，所以LOD值≥2.0认为显著连锁。

表1.4.5　家系12在标记X1的两点连锁值

	0.0	0.001	0.05	0.10	0.15	0.20	0.30	0.40
两点LOD值	2.41	2.40	2.21	2.00	1.77	1.54	1.02	0.47

参考文献：Terwilliger and Ott，1994

编者：Marcy C. Speer

单元1.5　非模式依赖的遗传连锁检验

当我们所要研究的疾病或性状并不遵从简单的孟德尔遗传规律时，就需要利用非模式依赖的方法（详见主要概念）来检验评价连锁。一般来说，可以使用非模式依赖方法得到关于连锁的初步证据，或者当使用通常的LOD值方法（单元1.4）得到的数据不是很明确时也需要使用非模式依赖。是否选择非模式依赖方法取决于所收集的数据。GENEHUNTER PLUS（例3）是一个有效的能对数据进行基因组扫描得到初步连锁证据的程序，因为它可以将整条染色体一起分析得到一个综合的结果。然而，如果对扩展的家系进行分析必须在丢失信息之前将其分割成小家系来分析，那么就必须使用其他的

方法来检验通过 GENEHUNTER PLUS 提供支持连锁证据的区域（例如，LOD 值大于 1 或者 GENEHUNTER PLUS 值大于 2）。假设使用的遗传标记是高度多态的，SimIBD 程序（http://watson.hgen.pitt.edu/～davis/）可以用来进行简单和有效的连锁检验。受累同胞对方法（例 1）可以使用所有的遗传标记进行分析，不管它们是不是高度多态，但前提是所研究的数据必须是来自同胞对。对于质量性状，可以将外显率设置为接近 0，以便将只研究受累个体的参数检验应用在有多代受累者的家系，即使在遗传标记信息含量不高时也可以这样应用。对于这种类型的分析要假定一个遗传模式（隐性或者显性），以便可以进行多重分析以及对多次检验进行校正。对于数量性状数据，家系是随机选择的，方差组分分析或者 Haseman-Elston（H-E）（例 2）方法能提供同参数方法相同的效力。

当大多数数据是来自于家系中，ASP 方法很简便而且有效（单元 1.2）。另一方面如果数据是包括受累个体随机分布在每个家系中的扩展家系，那么 ASP 方法的效力就很小了，必须使用 SimIBD 或者 GENEHUNTER PLUS。理论上说，对任何时候的数据都要进行多点分析。通常基于 IBD 的方法不能适用于多点分析。最近，一个 LINKAGE 的修改版本可以在随机个体中通过使用所有遗传标记来构建 IBD 共享。但是这种方法运行速度很慢。SOLAR 软件包（http://www.sfbr.org/sfbr/public/software/solar/index.html）中有一种类似的方法，它可以用来在核心家系众对多个连锁的遗传标记进行 IBD 共享的预测。图 1.5.1 提供了本单元中分析方法的选择树形图。

注意：对于本单元中讲述的所有计算分析，我们推荐使用基于 Unix 的平台。Solaris 操作系统可以编译和运行大多数遗传分析软件。另外，GENEHUNTER PLUS 需要 GCC 来进行编译。然而，SAGE 已经过编译可以用在一系列操作系统中。一般来说，可执行程序和程序的源代码应该保存在不同的文件夹中以便同用来进行遗传分析的程序分开。用来存放可执行文件的区域的 Softlink 可以通过键入 ln-s 来实现，或者系统管理员可以将可执行文件放在根文件夹中，这样就可以被所有人使用而不用通过 softlinks 了。

主要概念

模式依赖、非模式依赖及非参数分析

进行连锁分析经常使用的基于似然性的方法需要指定一个正确的模式：个体基因型以及相应的患病状态或者其他表型性状的关系。在常用的 LOD 值方法中，可能性的常用对数通过假定一个特定的遗传模式以及标记位点与疾病位点之间特定的重组率就可以计算出来。将这个数值与假定同样的遗传模式但是重组率设定为 50%时的可能性的常用对数进行比较。这个方法假定正确的遗传模式是已知的，如影响疾病易感性的等位基因的数目、每个等位基因的外显率及频率都要已知。非模式依赖的方法，如受累同胞对方法，不需要明确指定遗传模式。非参数分析方法除了不需指定遗传模式之外，还能避免假设决定显著性的统计量分布方式。

状态一致性和血缘一致性

如果两个个体在同一个位点共享同样的等位基因，那么这个等位基因就是状态一致

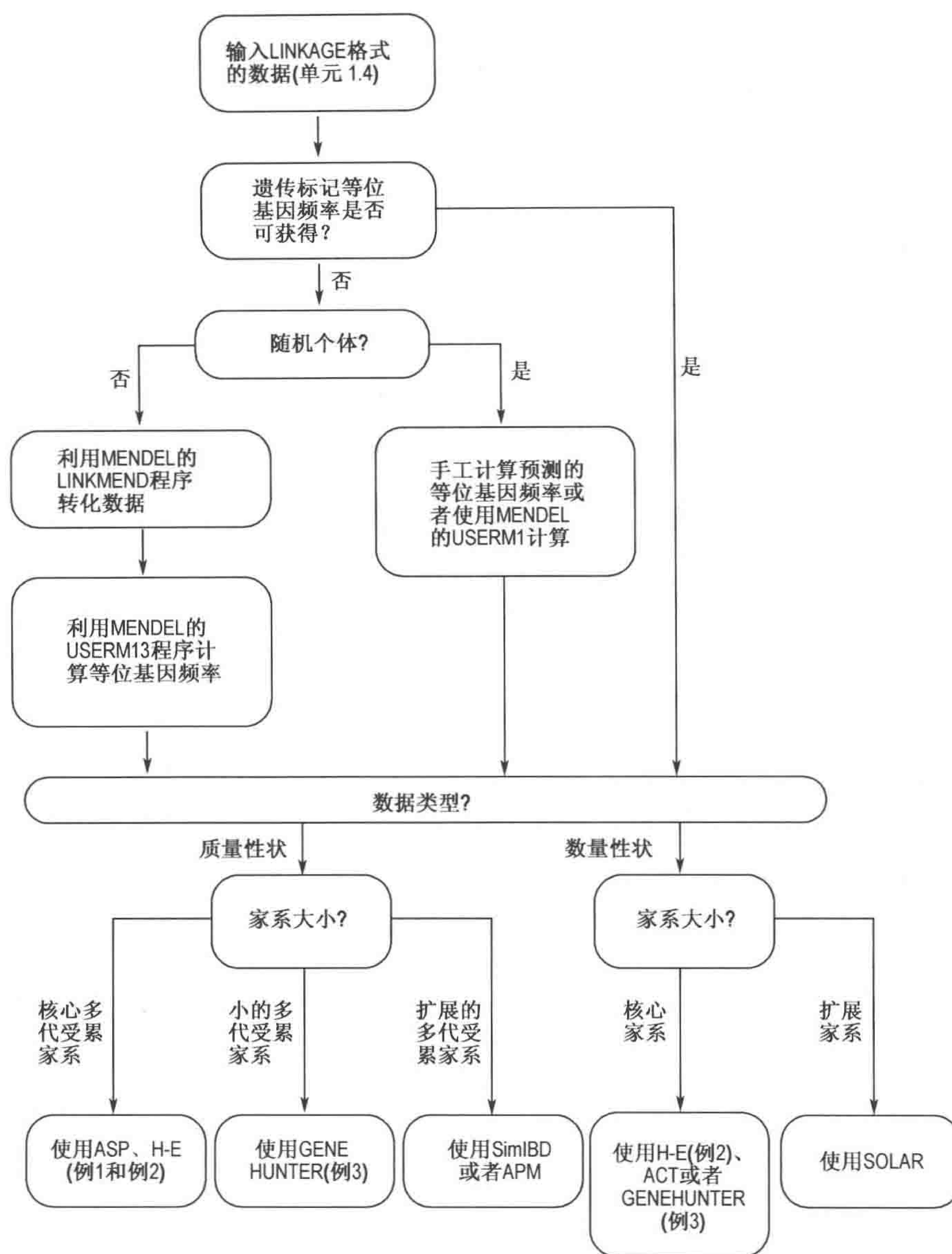


图 1.5.1 非模式依赖连锁分析决定树形图。

性等位基因。如果这两个个体从共同祖先那里获得了这个相同的等位基因，那么这个等位基因也被称作血缘一致性等位基因。根据孟德尔遗传方式，平均 1/4 的同胞共享两个 IBD 等位基因，1/2 的共享一个 IBD 等位基因，1/4 的不共享 IBD 等位基因。为了避免混淆，此单元中 IBD 只用在分析特定基因组区域时。在任何亲属之间共享常染色体遗传物质的平均比率称为亲缘系数（κ）。对于没有近亲婚配的个体亲缘系数是 $(1/2)^{R+1}$。这里，R 代表的是这对个体之间的关系程度，如对于一级亲属，$R=1$，$\kappa=1/4$；对于二级家属，$R=2$，$\kappa=1/8$。

IBD 信息经常用在成对个体共享 IBD 的一系列数据的等位基因比率中，这个比率

称为 π。通常情况下 π 必须从数据中估计到，这个估计的 π 以 $\hat{\pi}$ 表示。这个估计值是通过计算一对个体共享两个 IBD 的可能性加上 0.5 倍的这对个体共享一个 IBD 等位基因的可能性得出来的。图 1.5.2 显示的是一个简单家系，等位基因已经标出。表 1.5.1 列出了这个家系中既对个体间共享 IBS 和 IBD 的数目。假定研究的这个位点只有四种等位基因。

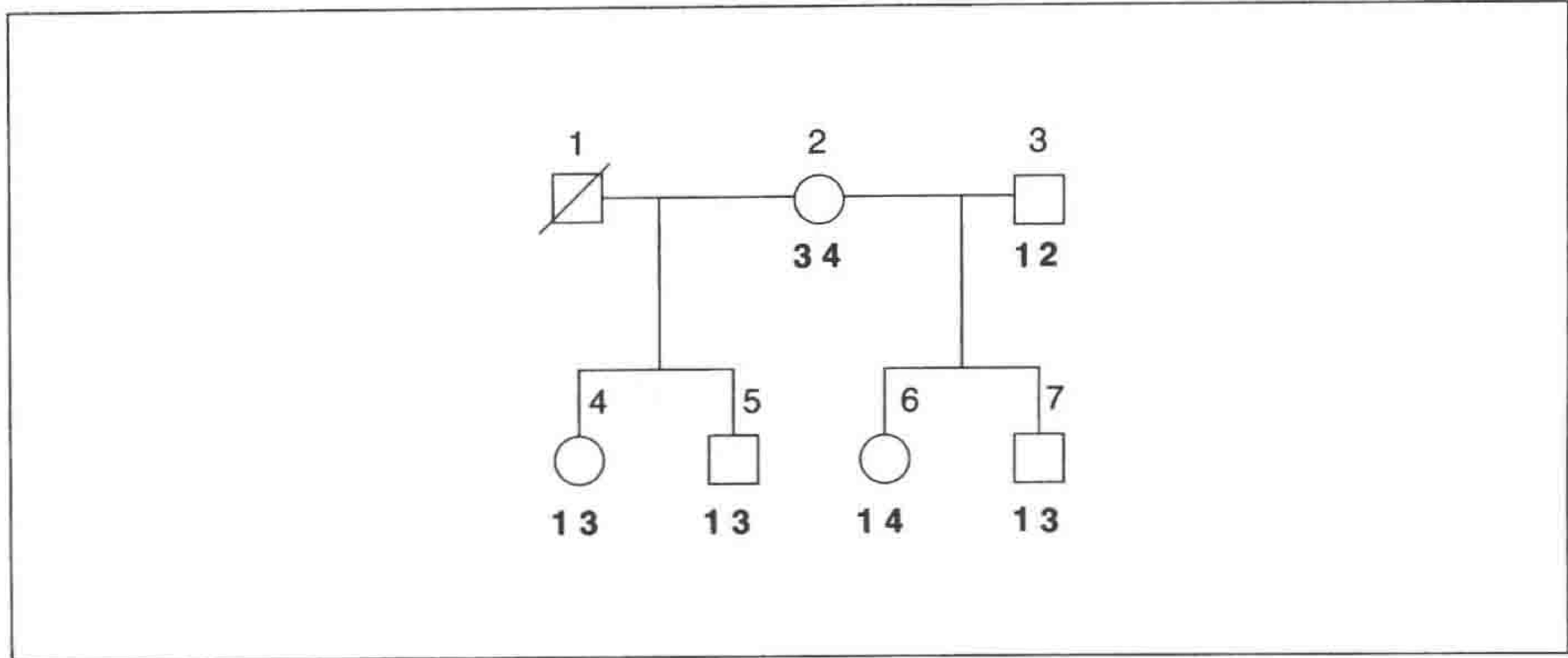


图 1.5.2　用来阐明计算 IBD 和 IBS 的简单家系。带斜线的方框代表死去的个体。

表 1.5.1　图 1.5.2 中几对个体共享等位基因 IBD 和 IBS

对	共享等位基因的数目		共享 IBD 等位基因的比例	亲缘系数
	IBS	IBD		
6-7	1	1	0.5	0.25
5-6	1	0	0	0.125
3-4	1	0	0	0

在图 1.5.2 的简单家系中，很明显个体 6 和个体 7 从他们父亲那里遗传了同一个“1”等位基因。但是不同的母本等位基因。因此他们共享一个 IBD 和一个 IBS 等位基因。尽管个体 5 和 6 都有“1”等位基因，但是这个等位基因不存在于他们的母亲中，因此这个“1”不可能遗传自共同祖先。相似地，个体 3 和 4 都有“1”等位基因，但是没有共同祖先，在这两种情况下，“1”等位基因只是 IBS 而不是 IBD。计算个体 4 和个体 5 共享 IBD 等位基因的比率更复杂，很明显“1”等位基因一定是遗传自已死去的个体 1，但是个体 1 的基因型无法推断出来，他的基因型可能是 1/1、1/2、1/3 或者 1/4。因此就有必要进行可能性计算以便推断出所有可能基因型的可能性的总和。为了计算个体 4 和个体 5 共享 IBD 的比率，用 P_{ij} 代表这个家系所在的种群中基因型 ij 的可能性（i 和 j 分别代表 1、2、3、4 等位基因中的一个）。那么可以按照下面公式计算共享 IBD 等位基因的比率：

$$\hat{\pi}=\frac{\frac{3}{16}p_{11}+\frac{1}{16}(p_{12}+p_{13}+p_{14})}{\frac{1}{4}p_{11}+\frac{1}{16}(p_{12}+p_{13}+p_{14})}$$

上面这个冗长的计算公式被 SIBPAL（例 2）或 GENEHUNTER（例 3）程序自动

运行。在一个家系中，其后代被研究但是父母没有被研究的个体称为建立者父母。我们研究的没有患病的嫁人这个家系的个体就是一种类型的建立者父母（通常称为 marry-ins）。在图 1.5.2 的这个简单家系中，建立者父母是 1、2 和 3。

统计学术语：均值、方差、偏度、峰度

本单元使用了四种描述一个统计量分布的方法。用 x_i 代表第 i 个观察值，i 从 1～n，那么均值（$\bar{x}$）可以这样计算：

$$\bar{x} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} x_i$$

而方差可以这样计算：

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{1}{n-1}\sum_{i=1}^{n}(x_i^*)^2$$

式中，x_i^* 代表 $x_i - \bar{x}$，方差衡量的是一系列数值的分布。标准差是方差的平方根。

偏度的计算公式根方差相似，只不过 x_i^* 是立方然后除以标准差的立方。对于正态分布而言，偏度为 0，这表示观察值关于均值是对称分布的。阳性的偏度提示大多数数值集中在分布的底层，只有一小部分数值分布在高层。

峰度的计算公式与方差也相似，只不过 x_i^* 提高到四次方然后除以标准差的四次方再减去 3。峰度反映的是相对于 0 峰度的正态分布，分布曲线的平坦或陡峭的情况。

假设检验

连锁分析通常对比两个互相对立的假设：存在连锁、不存在连锁。这是通过假设检验完成的，假设检验比较对于同一个数据集的两种陈述，如无效假设（不连锁）和可变假设（连锁）。无效假设是通过将描述数据的参数设定到特定的数值来产生一个统计量完成的。对于遗传学研究来说，可变假设通常使用的是比无效假设要宽松的参数设置，以便可变假设通常将无效假设作为一种可能性。简单的可变假设可以通过将无效假设下的特定参数值改变成可变参数值来产生。例如，我们可以检验一个无效假设：均值为 0，简单的可变假设是均值为 1.0，或者单边可变假设均值分布≤0，又或者双边假设均值等于任何数值。假设检验的显著性是指拒绝实际上正确的无效假设的可能性大小，如做出拒绝无效假设的错误判断的可能性大小。假设检验的效力是指可变假设是正确的情况下，能拒绝无效假设的可能性大小。假设检验通过产生一个能评价特定无效假设的统计量，将这个统计量与无效假设正确情况下的数据的分布进行比较。统计量的显著性通过比较观察值和参考分布提供的数值，代表了如果无效假设是正确的情况下获得观察到的检验统计量的可能性。在很多情况下，评价显著性的参考统计量分布可以从理论计算得到。对于本单元讨论的例子，参考统计量分布不是标准统计学教科书或者数学表格中常用的正态分布，也不是卡方分布。标注的统计软件包，如 SAS（Statistical Analysis System），可以用来评价显著性。

例 1　利用简单方法在受累同胞对（ASP）中进行连锁检验

在受累同胞对中利用 IBD 信息进行连锁检验有 3 种常用方法。这些方法都可以不

依赖于计算机程序进行。均值检验衡量在受累个体中是否有过量比例的期望 IBD（$\hat{\pi}$）传递下来。比例检验比较在同胞对中共享所有等位基因 IBD 的比例是否是 1/4，这个比例是在无效假设即没有连锁的情况下的期望比例。拟和优度检验比较同胞对共享 0、1 和 2 个等位基因的比例是不是分别为 1/4、1/2 和 1/4。这些检验的效力单元 1.2 依赖于疾病本身的遗传机制。构建最适合的连锁检验需要遗传机制的背景知识，然而这并不总是个可行的方法。然而，对于大多数可变假设来说均值检验比其他检验更有效。

对于有些高度多态位点，如人类组织相容性白细胞（human histocompatability leudocyte antigen，HLA）抗原和微卫星标记，IBD 共享可以马上得到鉴定。例如，考虑表 1.5.2 中的 HLA-DR 位点和胰岛素依赖性糖尿病的连锁，在 137 个受累同胞对中，59%的共享双等位基因 IBD，34%共享 1 个 IBD，7%不共享 IBD。用 n 代表受累同胞对的数目，f_2 代表共享 2IBD 等位基因的同胞对数目，f_1 代表共享 1 个 IBD 等位基因同胞对的数目，f_0 代表不共享 IBD 等位基因同胞对的数目。均值检验比较在受累同胞对中共享 IBD 等位基因的平均比例是不是 0.5，如它检验的是 $f_2+1/2f_1>0.5$ 是否成立。利用表 1.5.2 中的数据，检验统计量 t_2 可以这样计算：

$$t_2=(2f_2+f_1-1)\sqrt{2n}$$

$$t_2=[2(0.59)+0.34-1]\sqrt{2(137)}=8.61$$

表 1.5.2　在 137 对患有 IDDM 的同胞中共享的 HLA 系统 IBD 数目[a]

	f_2	f_1	f_0	总数
n	81	46	10	137
期望的比例	1/4	1/2	1/4	
期望的数目	34	69	34	

a 定义：n=受影响的同胞对数量；f_2=共享 2 个等位基因的 IBD；f_1=共享 1 个等位基因的 IBD；f_0=不共享等位基因的 IBD。

比例检验将 f_2 同 1/4 比较，同样的，利用表 1.5.2 中的数据，检验统计量是这样计算的：

$$t_1=\left(f_2-\frac{1}{4}\right)^2 4\sqrt{\frac{n}{3}}$$

$$t_1=(0.59-0.25)4\sqrt{\frac{137}{3}}=9.19$$

在 $n>60$ 的情况下这两种检验方法相当于正态分布。最后拟和优度检验可以用来比较在每个等位基因共享类别里个体的观察值和期望值。利用表 1.5.2 中的数据，拟和优度检验可以这样计算：

$$\chi^2=2n\left[2\left(f_2-\frac{1}{4}\right)^2+\left(f_1-\frac{1}{2}\right)^2+2\left(f_0-\frac{1}{4}\right)^2\right]$$

$$\chi^2=2(137)[2(0.59-0.25)^2+(0.34-0.5)^2+2(0.07-0.25)^2]=88.12$$

从这个公式得到的检验统计量可以同自由度为 2 的卡方检验比较。

上面的 3 种检验（利用表 1.5.2 中的数据）都产生了 $p<0.0001$。从比例检验得到的更显著的检验统计量（9.19）与从均值检验中得到的检验统计量（8.61）进行比较，

我们得出与 HLA-DR 连锁的位点是具有隐性遗传模式的。尽管计算起来比较简单，拟和优度检验与均值检验相比效力小，因此在同胞对分析中使用较少。

例 2　利用 SIBPAL 软件进行受累同胞对分析

例 1 中描述的检验在 IBD 很明显的时候很容易进行，如当标记是高度多态而且父母基因型已知。然而在很多情况下，这些条件不能满足，IBD 只能依靠估计。这种情况下就需要利用计算机程序进行复杂的计算了。更重要的是，当 IBD 是从数据中计算出来时，上面提到的公式有点保守而且与从观察值推断出的 IBD 共享的方差相比，效力要小一些。

SIBPAL

SIBPAL 是 SAGE 软件包的一个程序，它可以进行几个不依赖默示的遗传连锁检验。这里我们将解释两种检验。SIBPAL 通过使用在核心家系中所有数据来提供一套有效的算法。在 SIBPAL 中可以使用的检验包括均值检验（例 1）和 Haseman-Elston（H-E）检验。

Haseman-Elston 检验

Haseman-Elston 方法最初是为数量性状设计的，但是对质量性状也适用；我们需要的正是这一点。在 H-E 最原始的公式里，Y_{ij} 代表的是在第 i 对亲属中第 j 个个体的表型（通常是数量性状），H-E 检验利用这个转化公式：$Z_i=(Y_{i1}-Y_{i2})^2$。然后，Z_i 的值回归到 $\hat{\pi}_i$，这里 i 是同胞对的索引。任何一对亲属的回归系数仅仅依赖于重组率与属于任何与标记连锁的推断的遗传位点的遗传变异。连锁检验通过确定回归系数是否为负数来进行。更详细的描述在 SIBPAL 软件中。

利用 SIBPAL 进行分析

在进行分析之前，SIBPAL 使用的数据必须利用另一个 SAGE 的模块：Family Structure Program（FSP）对数据进行处理。可以写信得到 SIBPAL 或者 FSP 或者整个 SAGE 软件包：SAGE，Robert Eleston，Ph. D.，Case Western Reserve University School of Medicine Department of Epidemiology and Biostatestics，Metro Health Sciences Center，2500 Metro Health Drive，Cleveland，Ohio 44109。FSP 和 SIBPAL 模块注释的很好因此经过编译以后就可以直接应用，它们有详细的关于安装的指令，这是一个程序所必需的。

SAGE 软件包需要特定的输入格式。运行 SIBPAL 之前需要使用 FSP 将数据进行预处理。FSP 会通过产生 Pointers 将数据分割成核心家系。除此之外，FSP 还会检查家系结构中的不一致，同时提供概要的统计量。它也可以产生能用来进行模式依赖连锁分析和分析所需要的数据，这些分析也包括在 SAGE 软件包中。

下面是运行 SIBPAL 程序的步骤，使用的是在图 1.4.3 和图 1.4.9 中家系的 LINKAGE 格式的数据文件。

1. 将数据进行修改使之适合 FSP 格式。当建立者个体父母设定为空白（而不是

MAKEPED 需要的 0；单元 1.4）时，FSP 可以直接使用 LINKAGE 的数据。例如，在图 1.4.9 中，第 1、2、3、6、8、9、13、15、18、19 和 23 行的父母的 ID（0）要用如图 1.5.3 中的空白代替。同时也要修改一下标记的数据。最简单的标记基因型需要等位基因数目符合 9 个字母的格式：首先是用四个字符表示第一个等位基因数目，然后一个斜杠（/），最后是第二个等位基因的数目。如果使用这种格式，每个等位基因的数目

家系编号	个体编号	父系编号	母系编号	性别	受累状态	标记1		标记2		标记3	
1113	1	0	0	1	2						
1113	2	0	0	2	1						
1113	3	0	0	2	1						
1113	4	1	2	1	2	1	/3	1	/2	1	/2
1113	5	1	2	2	2						
1113	6	0	0	1	1						
1113	7	1	2	2	2						
1113	8	0	0	1	1						
1113	9	0	0	1	1						
1113	10	4	3	2	2	3	/4	2	/3	1	/3
1113	11	4	3	2	1	1	/4	1	/3	2	/2
1113	12	4	3	2	2						
1113	13	0	0	1	1	3	/3	2	/2	3	/3
1113	14	6	5	1	1	1	/2	1	/1	2	/3
1113	15	0	0	2	1	1	/4	1	/1	3	/3
1113	16	6	5	1	2	2	/3	1	/2	1	/2
1113	17	6	5	2	2	2	/3	1	/2	1	/2
1113	18	0	0	1	1	2	/2	2	/2	2	/3
1113	19	0	0	2	1	1	/2	3	/3	3	/3
1113	20	8	7	1	2						
1113	21	8	7	2	1	1	/4	1	/1	2	/2
1113	22	8	7	2	2	3	/4	1	/2	1	/2
1113	23	0	0	1	1						
1113	24	9	10	1	2	2	/3	2	/2	3	/3
1113	25	9	10	1	2	3	/3	1	/2	1	/2
1113	26	9	10	2	1	3	/4	1	/3	2	/3
1113	27	13	12	1	1	3	/4	2	/3	3	/3
1113	28	13	12	2	2	3	/3	2	/2	3	/3
1113	29	13	12	2	1	3	/4	2	/3	3	/3
1113	30	16	15	1	2	3	/4	1	/1	2	/3
1113	31	16	15	2	1	2	/4	1	/1	2	/3
1113	32	18	17	2	2	2	/3	2	/2	1	/3
1113	33	18	17	1	2	2	/3	2	/2	1	/2
1113	34	20	19	1	2	1	/3	2	/3	1	/3
1113	35	20	19	2	2	2	/3	2	/3	1	/3
1113	36	20	19	1	2	2	/4	1	/3	2	/3
1113	37	20	19	2	1	1	/4	1	/3	2	/3
1113	38	23	22	2	1	1	/4	1	/3	2	/3
1113	39	23	22	1	1	1	/4	1	/3	2	/3
	40	23	22	2	2	1	/3	2	/2	1	/3

图 1.5.3 图 1.4.3 中家系的数据，已经经过修饰，可以用在 SIBPAL 中。

必须按照顺序排列，如 2…/3…，这里每个点代表一个空格。例如，在图 1.4.9 中个体 16 的基因型 3…/2…，会被 SIBPAL 省略。运行 FSP 和 SIBPAL 需要的可以是别的文件格式，见图 1.5.3。

2. 建立 FSP 需要的参数文件，如图 1.5.4 所示。这个参数文件可以通过完成在 SAGE 因特网服务器上的询问来建立（http://darwin.cwru.edu/sagegui/main-menu.html）。FSP 参数文件的第 1 行是标题，最多有 80 个字符。为了创建 SIBPAL 中使用的核心家系，第 2 行第 5 栏为 1，第 10、15 和 20 栏为 0，第 25 栏表示的是在数据文件中每个个体的记录数目（这个例子中是 1）。26 和 27 栏表示的是男性和女性的代号（这个例子中的 1 和 2）。最后一行必须具有 FORTRAN 格式以便能读取数据，要以括号括起来。必须读取的数据包括：字符格式的研究 ID 号（最多允许 5 个字符）；整数格式的家系的 ID 号（最多允许 5 个整数）；字符格式的个体和其父母的 ID 号（每个最多 8 个字符）；性别（一个字符）。研究 ID 号可以空白。为了将单元 1.4 中的例 2 的数据读进来，我们可以使用图 1.5.4 中的格式。在这个格式中 T 代表传递到一个特定的栏，X 代表略过一栏，A 代表字符格式，I 代表整数格式。因为没有研究的 ID 号，第 5 栏是空白。

```
FSP RUN, EXAMPLE3
  1  0   0  0 112
(T5,A1,T1,I4,3X,A2,4X,A2,4X,A2,4X,A1)
```

图 1.5.4　用来运行 FSP 的参数文件，与图 1.5.3 中的数据对应。

3. 通过在提示行键入 sage31（也可以键入任何能启动 SAGE 的别名）调用程序。一旦 SAGE 调用了，一个菜单就会出现以便运行 SAGE 模式。在第一个提示行，键入 fsp 调用 FSP 程序，第二提示行，键入 fsp.par 提示参数文件的文件名运行 FSP。然后键入 example3.pre 提示需要分析的数据。尽管 FSP 可以对数据进行很多检验，但有些不能检测到的错误可能导致程序终止。能导致程序终止而没有提示信息出现的常见原因是没有在参数文件中（fsp. par）提供数值或者是提供了错误的数值。如果 FSP 终止运行，而且没有提供一个显示它已经处理了多少个家系的提示信息时，就需要检查一下参数文件。如果 FSP 或者 SIBPAL 没有运行完而终止，检查或者去除核心的 dumps，因为不删除的话会消耗磁盘空间。

4. FSP 运行完后，会产生两个文件。第一个是 fsp. inf，它提供的是有关家系结构的详细统计量。第二个是 fsp. lnk，它包括了将家系分成核心家系的数据。

5. 创建 SIBPAL 使用的参数文件 sibpal. par. 如图 1.5.5 所示。参数文件的要求在 Documentation 中有详细介绍，第 1 行中的标题是必需的（至多 80 个字符），第 2 行可以是空白：它允许用户索要可选的输出结果和（或）反应已经读进的数据。第 3 行应该具有这样的格式：

第 5 栏的 2 提示疾病结果；

第 10 栏的 3 提示有三个遗传标记；

第 15 栏的 1 提示一种疾病；

第20栏的1提示仅仅有univariable的回归；

第25栏的0提示没有使用权重；

第30栏的0抑制数据的plotting；

第35栏的0提示存在协变量。

在≥300对同胞可以分析的情况下，加权设计提供了理论上更加有效的连锁检验。第3行需要的格式是（T5、A1、T1、I4、3X、A2、T31、F1.0、T36、A9、4X、4X、A9）这样的语句。在这个语句中，研究的ID是（T5，A1），家系的ID是第一栏（T1，I4），个体ID是A2，疾病表型是F1.0，三个遗传标记使用的是字符格式（A9）。

```
对简单孟德尔疾病进行分析
1  1  1  1
2  3  1  1  0  0  0
dis  0  0  2  1
(T5、A1、T1、I4、3X、A2、T31、F1.0、T36、A9、4X、A9、4X、A9)
```

图1.5.5 受累同胞对分析的SIBPAL参数文件。

6. 建一个位点描述文件，如图1.5.6所示。因为这个标记是常染色体共显性体系（单元1.4），我们可以用一个简单的参数文件描述等位基因频率。对于第一个标记，第1行是标记名称（如M2），第2道第5行是1=0.3、2=0.3、3=0.05和4=0.35（表示的是等位基因频率）。下面的两行有分号表示所有等位基因的数目已经给出，基因型应该自动生长。在一个等位基因和其他的等位基因是共显性的标记系统，需要一种更复杂的数据结构，这种数据结构中的第二种基因型被这种形式取代：1=｛1/1，1/2｝。这

```
M2
1 = 0.3
2 = 0.3
3 = 0.05
4 = 0.35
;
;
M3
1 = 0.4
2 = 0.1
3 = 0.5
;
;
M4
1 = 0.05
2 = 0.4
3 = 0.55
;
;
```

图1.5.6 SIBPAL分析用的位点描述文件。

种形式意味着表型 1 可以从 1/1 基因型产生，也可以从 1/2 基因型产生。

7. SIBPAL 现在可以运行了。首先在提示行键入 sage31，然后等 SAGE 菜单出现后键入 sibpal。然后用户就被要求提供参数文件名、位点描述文件、数据文件和 fsp-pointer 文件（通过 fsp 程序产生的 fsp. lnk)。在运行过程中，会有信息提示关于标记的 IBD 状态，然后其他信息提示进程正在使用每个表型（这个例子中，只有一个表型被指定）进行分析，如果程序不提供这些信息，可能是因为参数文件有错误，一般是由于不正确的格式引起的。而且一旦程序已经运行，输出文件（sibpal. sum，sibpal. out，sib-pal. opt）必须删除或者移走以便 SIBPAL 能够再次运行。

结果的解释

最初的结果在单元 22 中。SIBPAL 返回的重要的结果在表 1.5.3 中的均值检验和表 1.5.4 中的 H-E 线性回归分析，其中有些结果已经四舍五入到三位小数。

表 1.5.3 SIBPAL 输出的均值检验分析

位点	受累同胞数	对数	均值	标准差	标准误	T 值	p 值
M2	0	2	0.796	0.065	0.046	6.429	0.0117*
M2	1	14	0.317	0.164	0.044	4.174	0.0005**
M2	2	6	0.519	0.298	0.122	0.156	0.4406
M3	0	2	0.875	0.177	0.125	3.000	0.0477*
M3	1	14	0.310	0.237	0.063	2.999	0.0048**
M3	2	6	0.547	0.252	0.103	0.459	0.3314
M4	0	2	0.668	0.177	0.125	1.340	0.1561
M4	1	14	0.398	0.209	0.056	1.832	0.0442*
M4	2	6	0.433	0.326	0.133	−0.506	1.0000

* 表示 $p<0.05$，** 表示 $p<0.01$。

表 1.5.4 SIBPAL 的 Haseman-Elston 线性回归分析

表型	位点	有效自由度	全同胞 π 均值	Y 对 π 的回归			
				T 值	p 值	截距	斜率
dis	M2	13	0.416	−2.805	0.007**	1.083	−1.074
dis	M3	13	0.426	−2.830	0.007**	1.030	−0.925
dis	M4	13	0.432	−0.841	0.208	0.800	−0.380

** 表示 $p<0.01$。

在表 1.5.3 中，第 1 行提供的是在所有同胞对中都不受累的同胞（这里只有两对这样的同胞）的 M2 等位基因的分析。在这个疾病位点的等位基因均值比例是 0.796，标准差是 0.065 均值的标准误是 0.046。T 值是通过均值减去期望值（0.5）然后除以均值的标准误，这里 $T=(0.796-0.5)/0.046=6.429$. 将这个值同自由度为 1 的 t 分布提供的 p 值 0.0117 比较。第 4 行和第 7 行分别提供的是在所有同胞对中都不受累的同胞中 M3 和 M4 等位基因的均值检验结果，然后将在这样的受累同胞对中的等位基因比例同在标有 T 值那一栏的 0.5 比较。第 2 行、第 5 行和第 8 行提供的是不一致的同胞对（受累和不受累）中相同的 M2、M3 和 M4 等位基因的检验。第 3 行、第 6 行和第 9 行

提供的是两个同胞都受累时三个等位基因的检验情况。

在遗传连锁的假设下，状态一致的同胞理论上应该共享大于 0.5 的 IBD 等位基因频率标有 p 值得那一列是单侧假设检验，它衡量在状态一致的同胞对中 IBD 的均值是不是>0.5，在状态不一致的同胞中 IBD 的均值是不是<0.5。对于低外显率的遗传疾病，只有受累同胞对才能提供检验遗传连锁的有效信息。然而，因为这个例子中研究的疾病基因是完全外显的，所以一致的和不一致的受累同胞对都可以提供连锁的证据。这里不一致的同胞对要多于一致的受累同胞对，因此从这些数据中检验连锁的效力要大于从一致的受累同胞对中检验连锁的效力。表 1.5.3 中的数据表明 M2 和 M3 等位基因与疾病连锁。对于低外显率的疾病，只有受累的同胞对包含连锁的信息，不一致的同胞或者一致的位受累同胞是没有意义的。

表 1.5.4 提供的是 Haseman-Elston 线性回归分析的结果。第 1 列提示疾病表型已经考虑；第 2 列表示标记位点已经考虑；第 3 列提供创建假设检验所需的自由度；第 4 列提示在所有同胞中（包括一致和不一致的同胞对）共享的 IBD；第 5 列是指疾病状态一致的同胞对中标记位点共享 IBD 的 t 检验；第 6 列提供这个检验的 t 值同自由度为 13 的 t 检验进行比较。最后第 7 列和第 8 列提供的是预测的回归系数。这些结果提供了 M2 和 M3 是与疾病位点连锁的（第 6 列的星号表示）。没有显著的证据表明 M4 与疾病位点连锁。

例 3 利用 GENEHUNTER 和 GENEHUNTER PLUS 进行分析

非模式依赖的遗传连锁分析也可以通过使用正确的方法计算在扩展家系中亲属共享的 IBD 来进行。这一节介绍的是使用 GENEHUNTER 和 GENEHUNTER PLUS 达到这个目的，这个软件易用而且可以对多个遗传标记分析。GENEHUNTER 软件使用的是 Green-Lander 算法的修改版本，完成分析的计算时间与遗传标记位点的数目呈线性关系。因此我们可以一次分析一条染色体。因为从单条染色体上输出的结果可以很方便整理，因此这将大大有利于基因组扫描。然而随着家系成员数目的增加，对计算（时间和容量）的要求也呈指数增加，这样就限制了这种算法的应用只能在大约 25 个个体的家系中进行，大的家系必须分割成小的家系以便进行分析，这就会导致信息的丢失。当使用非模式依赖的方法仅仅评价受累个体时，缩减家系大小的第一步就是略去未受累个体，然而因为未受累个体有时会包含对未分型个体潜在的基因型信息，这样也会导致信息的丢失。因此，如果父母没有进行基因分型或者未受累同胞与同胞对中其他个体具有不同基因型时，这样的个体就不应该被删除。

GENEHUNTER PLUS 是对 GENEHUNTER 的修改，它允许使用不完整的遗传标记信息创建一个连锁检验。模拟试验和在数据上的应用已经证明这个修饰比 GENEHUNTER 给出的 NPL 值可以更加有效地检验连锁。GENEHUNTER2.0 版本的网络版文件和 PDF 版文件可以从 http://linkage.rockefeller.edu/soft/gh/得到。

利用 GENEHUNTER 和 GENEHUNTER PLUS 进行分析

这些程序可以从互联网服务器得到：http://www.fhcrc.org/labs/kruglyak/Downloads/index.html，点击正确的链接然后下载 ghp-1.2.tar.gz（如果这是最新版本）。一

旦将文件下载，这个文件要通过分别键入 gunzip ghp-1. 2. tar. gz 和 tar xvpf ghp-1. 2. tar 解压缩然后重新分析。也可能需要通过提供的 Make utilities 进行重新编译。

1. 组织数据。图 1. 4. 9 提供的家系太大以至于不能使用 GENEHUNTER PLUS 直接分析，我们必须首先将其分割成小家系。一种分割这个家系的方法是将共同的父母亲个体 4、5 和 7 忽略。然后图 1. 4. 4 提供的家系文件的修饰版本会将个体 1 和 2 删除，而且 4、5、7 个体的父母会被提示不存在。家系的身份号码需要重新制定以便 4、5、7 的后代是独立的，如图 1. 5. 7 所示。

Family ID	Individual ID	Father ID	Mother ID	Sex	Affection	Marker1 allele1	Marker1 allele2	Marker2 allele1	Marker2 allele2	Marker3 allele1	Marker3 allele2
1	3	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0
1	4	0	0	1	2	1	3	1	2	1	2
1	9	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
1	10	4	3	2	2	3	4	2	3	1	3
1	11	4	3	2	1	1	4	1	3	2	2
1	12	4	3	2	2	0	0	0	0	0	0
1	13	0	0	1	1	3	3	2	2	3	3
1	23	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
1	24	9	10	1	2	3	2	2	2	3	3
1	25	9	10	1	2	3	3	1	2	1	2
1	26	9	10	2	1	3	4	1	3	2	3
1	27	13	12	1	1	3	4	2	3	3	3
1	28	13	12	2	2	3	3	2	2	3	3
1	29	13	12	2	1	4	3	2	3	3	3
2	5	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0
2	6	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
2	14	6	5	1	1	1	2	1	1	2	3
2	15	0	0	2	1	1	4	1	1	3	3
2	16	6	5	1	2	3	2	1	2	1	2
2	17	6	5	2	2	3	2	1	2	1	2
2	18	0	0	1	1	2	2	2	2	2	3
2	30	16	15	1	2	3	4	1	1	2	3
2	31	16	15	2	1	4	2	1	1	2	3
2	32	18	17	2	2	3	2	2	2	1	3
2	33	18	17	1	2	2	3	2	2	1	2
3	7	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0
3	8	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
3	19	0	0	2	1	1	2	3	3	3	3
3	20	8	7	1	2	0	0	0	0	0	0
3	21	8	7	2	1	1	4	1	1	2	2
3	22	8	7	2	2	3	4	1	2	1	2
3	23	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
3	34	20	19	1	2	1	3	2	3	1	3
3	35	20	19	2	2	3	2	2	3	1	3
3	36	20	19	1	2	4	2	1	3	2	3
3	37	20	19	2	1	1	4	1	3	2	3
3	38	23	22	2	1	1	4	1	3	2	3
3	39	23	22	1	1	1	4	1	3	2	3
3	40	23	22	2	2	1	3	2	2	1	3

图 1. 5. 7　用来进行 GENEHUNTER PLUS 分析的家系数据。

2. 运行 GENEHUNTER 。GENEHUNTER 使用的是 C 编程语言以便调用子程序。可以通过键入 ghp 进入编程语言。网上的帮助可以提供命令选择的指导。然而，一系列的命令（这里称为 script. in）也可以在调用 ghp 时附加一个文件进行批处理，键入 ghp<script. in。下面的就是一系列数据运行 GENEHUNTER。注意每一行之前的数字不要提供给 GENEHUNTER，这只是在为了清楚说明而使用的。

1. photo ghp _ example3. out
2. max bits 20
3. skip large off
4. load example3. par
5. map function kosambi (default)

6. increment step 5 (default)
7. off end 0.10
8. ps on
9. haplotype off
10. score all (default)
11. scan example3.gpre
12. total stat het
13. npl _ ghp _ example3.ps
14. lod _ ghp _ example3.ps
15. inf _ ghp _ example3.ps
16. quit

按照顺序讲解，这些命令告诉 GENEHUNTER：①将运行的结果输出在文件 ghp _ example3.out 中；②将最大记忆容量从默认的 16 增加到 20bit；③关掉略过大家系的选择；④运行图 1.4.11 给出的连锁位点描述文件 example3.par；⑤使用 Kosambi 图谱功能；⑥使用五步计算法在遗传标记之间运算；⑦两个遗传标记之间分十个重组率计算 LOD 值；⑧提供 PostScript 文件；⑨不提供所有个体最可能的单体型；⑩使用默认的所有检验统计量；⑪分析图 1.5.7 所示的 example3.gpre 文件；⑫给出所有家系的分析结果，包括杂合度检验；⑬～⑮NPL 值、LOD 值和遗传标记信息含量图的 PostScript 文件名；⑯退出程序；这里需要注意的是 GENEHUNTER 使用的默认图谱是 Kosambi 图谱，这个图谱式适用于小鼠，但是一般认为也可以用于人。同时还要注意到 GENEHUNTER 略过了图 1.4.11 所示的文件 example3.par 的第一个间距（如果第 2 行第 1 个数字是 1，那么表示的是性状位点），因为程序认为这是位置固定的疾病位点和遗传标记位点之间的一个需要预测的间距。

这个分析的结果在表 1.5.5 中。第 1 列给出的是遗传标记在染色体上的位置，用 cM 表示，第一个遗传标记设置为 0。第 2 列给出的是在 example3.par 文件中设定的模式下的 LOD 值。这些 LOD 值比图 1.4.13 和图 1.4.17 的小，这反映了当把家系分割成小家系时丢失了信息。第 3 列给出了在文件 example3.par 提供的参数模式下的 LOD 值和一个用来表示遗传异质性的参数。这个参数 α 反映的是数据中的遗传异质性，α 为 1 时表示没有遗传异质性，α 为 0 时表示遗传异质性很大，没有几个家系提供连锁的证据。第 4 列给出的是非参数连锁值（nonparametric linkage score，NPL）。高的 NPL 值表示连锁证据对于有完全信息含量的遗传标记，NPL 值是正态分布的。因此 NPL 值不等同于 LOD 值。NPL 值可以转化成 LOD 值通过将其平方后再除以 4.6。对于信息含量不高的遗传标记，NPL 值的效力要小于 GENEHUNTER PLUS 提供的 ASM 检验。第 5 列提供的是假定 NPL 是正态分布的情况下 NPL 值的 p 值，最后一列给出的是研究的遗传标记的信息含量，信息含量等于 1 表示完全信息含量，信息含量等于 0 表示没有信息含量。

表 1.5.5 GENEHUNTER 分析的结果

位置(cM)	LOD 值	(α,异位性 LOD 值)	NPL 值	p 值	信息含量
−10.14	3.475	(1.000,3.475)	2.013	0.0593	0.3204
−8.11	3.594	(1.000,3.594)	2.235	0.0398	0.3784
−6.08	3.685	(1.000,3.685)	2.480	0.0269	0.4463
−4.05	3.726	(1.000,3.726)	2.746	0.0164	0.5267
−2.03	3.653	(1.000,3.653)	3.033	0.0106	0.6247
0.00	2.829	(0.878,2.852)	3.343	0.0083	0.7632
0.62	2.759	(0.895,2.774)	3.151	0.0095	0.7345
1.24	2.644	(0.901,2.657)	2.956	0.0116	0.7245
1.86	2.462	(0.890,2.477)	2.760	0.0162	0.7249
2.48	2.139	(0.855,2.168)	2.567	0.231	0.7357
3.09	−0.282	(0.375,1.321)	2.380	0.0312	0.7646
4.15	−0.189	(0.385,1.134)	1.779	0.0818	0.7164
5.20	−0.334	(0.384,0.887)	1.275	0.1302	0.6963
6.25	−0.695	(0.361,0.543)	0.884	0.1612	0.6930
7.31	−1.415	(0.200,0.063)	0.611	0.1862	0.7069
8.36	−4.992	(0.000,−0.000)	0.453	0.2150	0.7503
10.39	−1.334	(0.007,−0.001)	0.429	0.2206	0.6151
12.42	−0.379	(0.323,0.091)	0.405	0.2272	0.5188
14.44	0.119	(0.550,0.250)	0.376	0.2342	0.4397
16.47	0.421	(0.840,0.427)	0.348	0.2404	0.3729
18.50	0.614	(0.997,0.613)	0.320	0.2492	0.3158

在这个例子中,在已经分型的处于几个 cM 内的 3 个遗传标记具有相对较高的信息含量,因此从 NPL 值得出的 p 值应该是比较可信的。但是对于染色体远处的遗传标记,如果遗传标记的信息含量较低(如约小于 0.6),那么这个 p 值就有点保守。为了提供精确的 p 值,就需要利用 GENEHUNTER PLUS 提供的 ASM 检验。

3. 运行 ASM 程序。假定 GENEHUNTER PLUS 已经下载而且通过 ghp 命令运行了,所有需要运行这个程序的文件已经准备好。ASM 程序中,对等位基因共享的增加对疾病发展的影响有两种模式,一种是线性,一种是指数性。线性模式对于加性或者显性遗传模式比较适用,而指数模式对于隐性遗传模式比较适用。这个程序在每个位置搜寻由于疾病和遗传标记连锁而带来的亲属对之间等位基因共享的增加。我们可以不指定需要搜寻的范围,对于当前的分析来说,如果键入 asm lin ,就会得到表 1.5.6 中的结果了。

表 1.5.6　GENEHUNTER PLUS 分析的结果

位置(cM)	NPL 值	KC 值	KC LOD 值	δ 值
−1.01E+01	2.01E+00	2.12E+00	9.73E−01	1.06E+00
−8.11E+00	2.23E+00	2.19E+00	1.04E+00	1.06E+00
−6.08E+00	2.48E+00	2.27E+00	1.11E+00	1.06E+00
−4.05E+00	2.75E+00	2.34E+00	1.19E+00	1.06E+00
−2.03E+00	3.03E+00	2.41E+00	1.26E+00	1.06E+00
0.00E+00	3.34E+00	2.48E+00	1.33E+00	1.06E+00
6.19E−01	3.15E+00	2.43E+00	1.28E+00	1.06E+00
1.24E+00	2.96E+00	2.37E+00	1.22E+00	1.06E+00
1.86E+00	2.76E+00	2.30E+00	1.15E+00	1.06E+00
2.48E+00	2.57E+00	2.21E+00	1.06E+00	1.06E+00
3.09E+00	2.38E+00	2.10E+00	9.58E−01	1.06E+00
4.15E+00	1.78E+00	1.96E+00	8.36E−01	1.06E+00
5.20E+00	1.28E+00	1.79E+00	6.99E−01	1.06E+00
6.25E+00	8.84E−01	1.59E+00	5.52E−01	1.06E+00
7.31E+00	6.11E−01	1.37E+00	4.10E−01	1.06E+00
8.36E+00	4.53E−01	1.18E+00	3.01E−01	1.06E+00
1.04E+01	4.29E−01	1.15E+00	2.87E−01	1.06E+00
1.24E+01	4.03E−01	1.12E+00	2.72E−01	1.06E+00
1.44E+01	3.76E−01	1.08E+00	2.55E−01	1.06E+00
1.65E+01	3.48E−01	1.05E+00	2.39E−01	1.06E+00
1.85E+01	3.20E−01	1.01E+00	2.21E−01	1.06E+00

参考文献：Almasy and Blangero，1998；Blackwelder and Elston，1985；Haseman and Elston，1972；Kruglyak and Lander，1995；Risch，1990

编者：Christopher I. Amos

单元 1.6　利用 DNA 池技术进行纯合子定位

遗传连锁定位就是根据一些相关个体以远大于偶然因素共患某种疾病的现象来鉴定这些人共同享有的疾病基因区域。下面将要介绍的 DNA 池技术对于定位某些家系内患者都享有从共同祖先传递下来的一段基因组纯合区域的常染色体隐性遗传疾病尤其适用(图 1.6.1)。这些家系包括从家系信息提示受累个体来源于共同祖先的近亲家系。同时，这种方法对于定位受累个体由于具有相同的表型而且来自于同一个遗传隔离群从而有可能从共同祖先遗传同种疾病也是适用的。

主要概念

DNA 池

一种用来简化寻找继承于最先共同的染色体区域的方法是对相关受累个体进行基因分型。血缘一致性等位基因共享可以通过将等量的患者 DNA 汇聚成一个 DNA 池，然

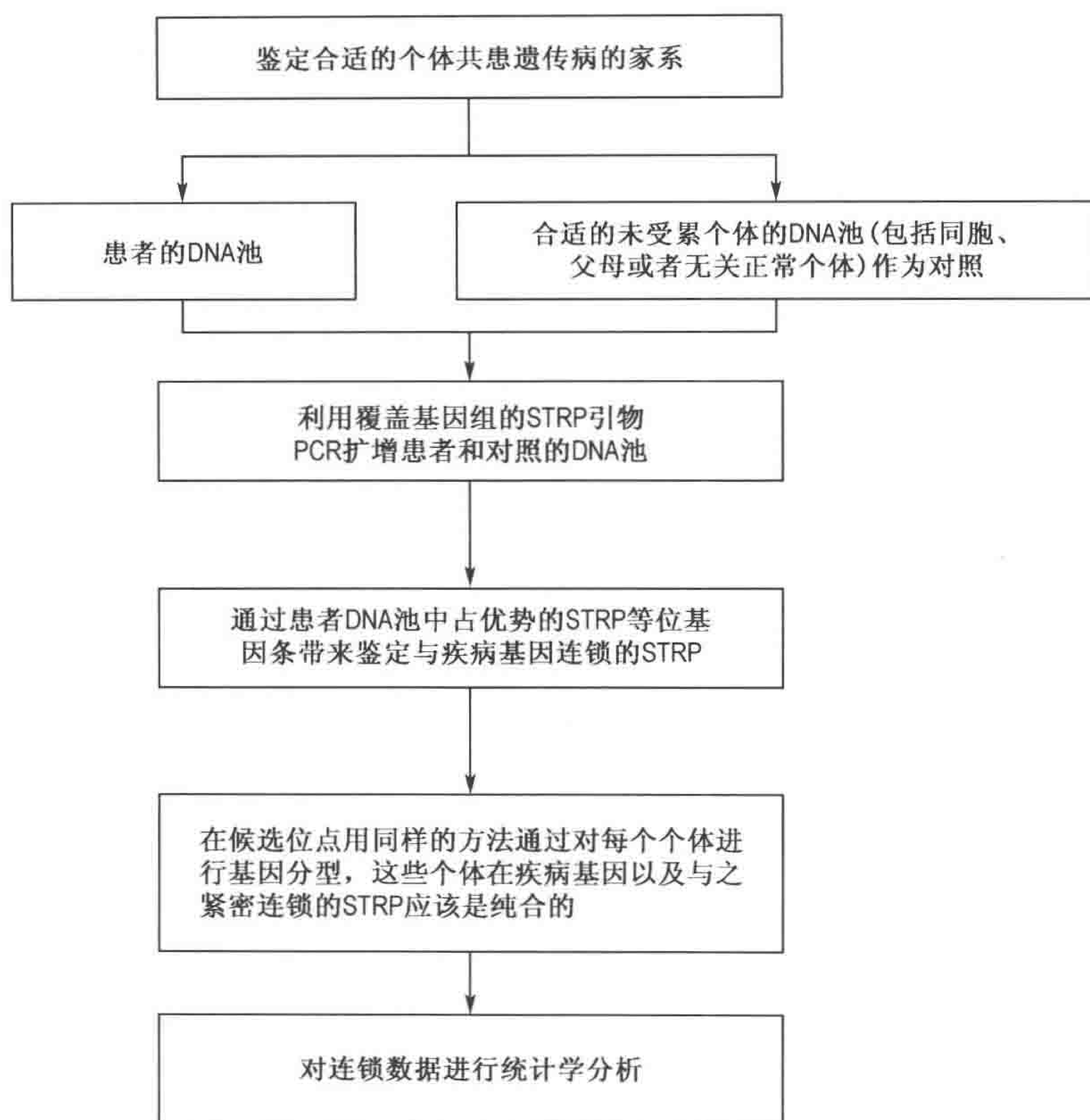


图 1.6.1　DNA 池流程图。利用短串联重复多态引物（STRP）定位隐性疾病基因。

后利用遍布于基因组的短串联重复多态引物（STRP；也被称为简单序列重复多态性，SSLP）进行分析。一个 DNA 池中的给定的等位基因频率可以通过凝胶上的等位基因条带浓度来得到。每个 STRP 等位基因的数目和相对频率可以与来自于无关对照的 DNA 池进行对比。由于 DNA 池样品是根据每个人的表型来进行划分的（如受累和不受累），因此，与疾病位点相连锁的 STRP 在这两个 DNA 池中就会有不同的等位基因

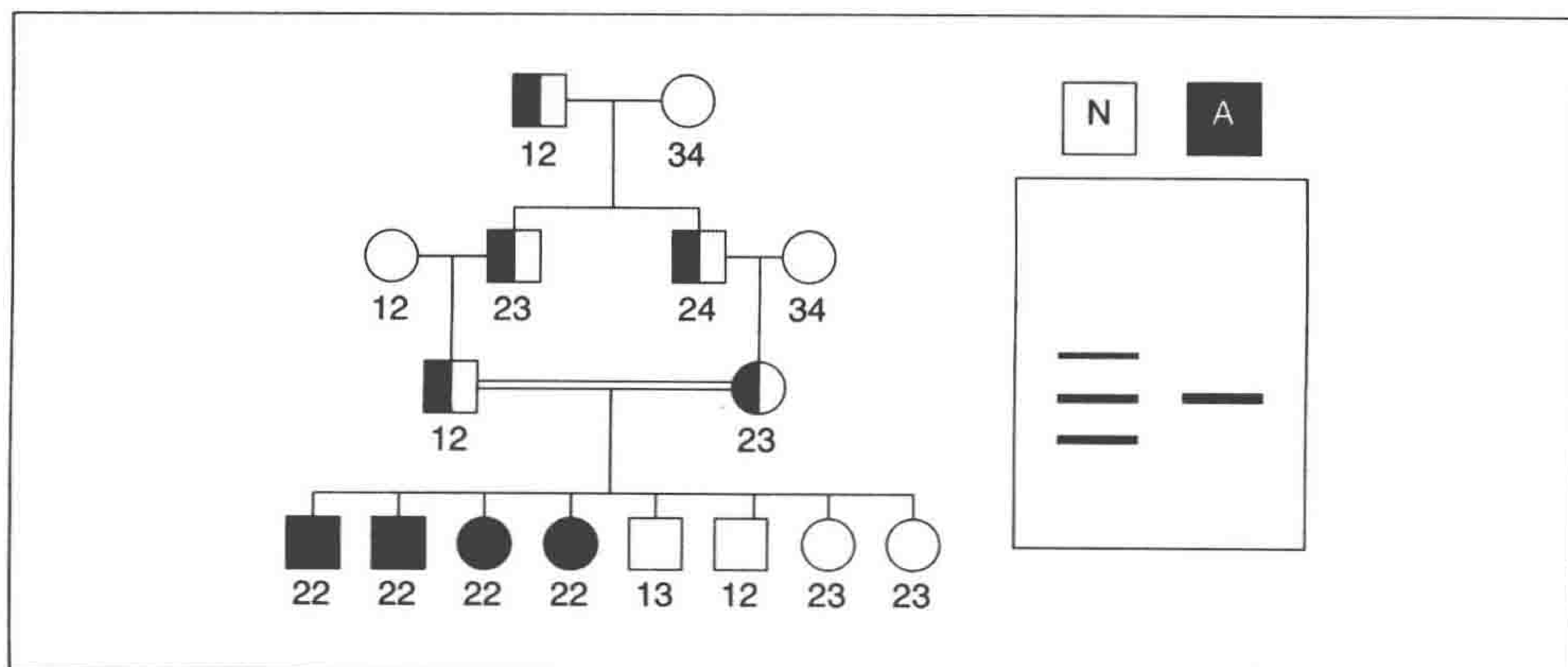


图 1.6.2　与常染色体隐性疾病连锁的 STRP 标记在近亲家系中的凝胶模式。

频率（图 1.6.2），这可以从凝胶上的数目和条带浓度估计。与之相反，不连锁的标记在这两个 DNA 池中就会表现出相同的等位基因频率（图 1.6.3）。利用 DNA 池技术可以极大地减少鉴定疾病基因位点的基因分型工作量。

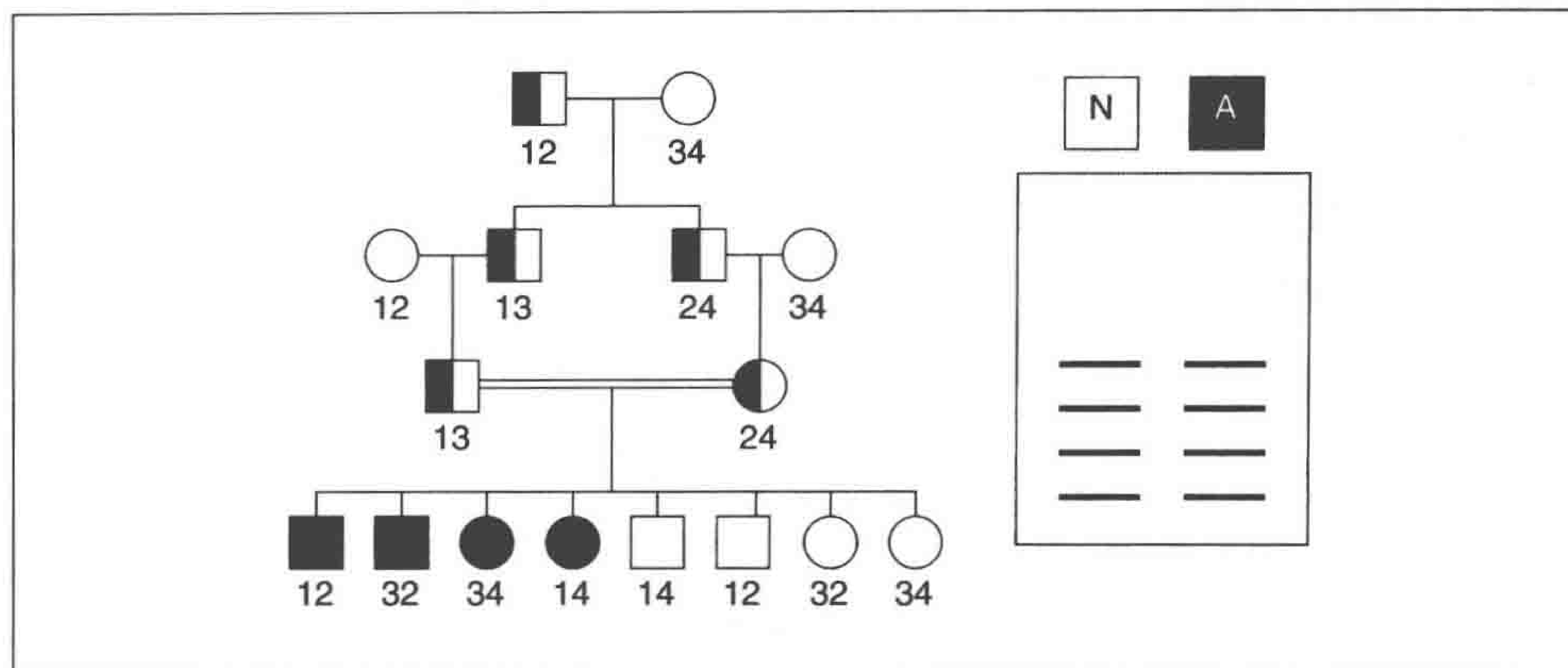


图 1.6.3 不与常染色体隐性遗传疾病连锁的 STRP 标记在近亲家系中的凝胶模式。

纯合子定位

纯合子定位的理论基础是，在近亲婚配的后代中由于具有共同祖先来源的血缘一致性等位基因，基因组的一部分是纯合的。除了受累个体共享的疾病基因位点之外，在这些近亲婚配的后代中纯合区域是随机分布的。来源于几个近亲婚配的家系的受累后代可以用来鉴定在所有受累后代中纯合的基因组区域，这些区域可能包含疾病基因位点。纯合子定位对于近亲婚配家系或者隔离群体尤其适用，这些群体中的受累后代可能由于来源于共同的祖先从而继承两个拷贝的等位基因。在这种情况下，所有受累个体并不仅仅是纯合，而是对于标记附近的共享等位基因是纯合的。

基本策略

扩增和分析 DNA 池

材料

受累和对照个体的 DNA 样品

√TE 缓冲液，pH7.4

短串联重复多态引物（STRP）

√10×储存缓冲液

√2.0mmol/L 的 4dNTP 混合液

5U/μl 的 *Taq* DNA 聚合酶

轻矿物油

√去离子甲酰胺载样缓冲液

Rain-X（UNELKO）或者 Sigmacote（Sigma）

√Binding solution

96 孔 PCR 板或者 0.5ml 的离心管

热循环仪，最好是能适合 96 孔 PCR 板的

变形聚丙烯酰胺凝胶电泳仪器

水浴，或者 95℃热激

1. 根据吸光光度值将每个个体的 DNA 用 TE 缓冲液稀释到 100ng/μl，然后再测一次以确保样品浓度为 100ng/μl±10ng/μl。
2. 利用一对或者两对 STRP 引物对每个 DNA 样品进行 PCR 扩增，以确保所有样品都等量扩增。
3. 把等量的患者 DNA 混合在一起，每个个体 2μg 溶解在 20μl 水中（这些足够完成一次 10cM 密度的基因组扫描），这样得到 100ng/μl 的浓度（这里是总体的 DNA 浓度，不是每个个体的 DNA 浓度），然后通过加入 4 倍体积的水稀释到 20ng/μl。
4. 用同样的方法将正常对照的 DNA 样品混合在一起，同样稀释到 20ng/μl。
5. 将不同的 DNA 池中的样品 2μl（40ng）加入到单个的孔或者 0.5ml 的离心管中。如果对所使用的 STRP 引物的等位基因模式不熟悉，可以通过增加一个对照：加入一个个体的 20ng DNA 以便于解释 DNA 池的等位基因模式。
6. 处理好包含每对引物浓度为 1.25pmol/L 的引物混合物（如果 STRP 扩增的片段大小不重叠，那么可以把两对或者多对引物放在一起进行扩增）。
7. 准备 PCR 体系（对于 96 个反应）：

   10×储存缓冲液 100μl；

   2.0mmol/L 的 4dNTP 混合液 125μl；

   ddH_2O 375μl；

   5μl 5U/μl 的 *Taq* DNA 聚合酶。
8. 将上述的 PCR 溶液加入 6μl 到 96 孔板的孔中，每个孔中还有 DNA 和 STRP 引物，共有 10μl，如果热循环仪没有热盖则在每个孔中加入轻矿物油，按照下述条件进行 PCR 扩增。

   预变性：　94℃，3min

   35 个循环：94℃，30s

   　　　　　55℃，30s

   　　　　　72℃，30s
9. 准备好用来进行聚丙烯凝胶电泳的玻璃板，用 Rain-X 或者 Sigmacote 处理长胶板，用结合溶液处理短胶板。
10. 准备 6%的聚丙烯酰胺凝胶（丙烯酰胺和双丙烯酰胺之比为 19∶1；附录 3F），等胶聚合后，以 60W 预电泳 10min。
11. 上样前，将样品用水浴或者 95℃热激 3min，然后马上置于冰上，每孔点样量为 4μl，患者和对照的样品交替点样以方便比对等位基因模式，恒功率 60W 电泳 1h 45min。
12. 银染（单元 2.1）和通过比较患者和对照的胶图得到结果。牢记以下几点已得到正确的与疾病基因连锁的 STRP。

a. 考虑遗传模式。DNA池技术对于患者来源于共同祖先从而可能在疾病位点纯合的常染色体隐性遗传病最为适用。在这种情况下，在和疾病位点紧密连锁的STRP标记出，在患者DNA池中，应该只看到一种优势等位基因。

b. 考虑家系结构。在标记和疾病基因位点之间的重组会根据重组事件所处的位置导致患者DNA池出现不同的等位基因模式。例如，在一个父母是一级表亲的核心家系中，发生在父母和一个后代之间的重组事件会产生一个占绝对优势的等位基因和另一个等位基因（这个等位基因只在一个个体内出现）。然而，如果重组事件发生在上一代之间，那么就会导致在患者DNA池中出现两种等量的等位基因，因此对于一个给定的家系，考虑好等位基因的模式是很重要的。

c. 考虑与之邻近的标记数据。如果一个标记与疾病基因连锁，那么与之邻近的标记应该会有提示性的信息。一组提示连锁的标记远比一个提示连锁的标记说明作用大。

d. 识别没有信息含量的标记。在对照中指出现一种条带的标记是没有信息含量的。一次基因组扫描没能鉴定出连锁区域，应该使用该标记附近的其他STRP进行分析。

参考文献：Hastbacka et al.，1992；Houwen et al.，1994；Lander and Botstein，1987

编者：Val C. Sheffield

单元1.7 疾病关联和基于家系的检验

当我们研究患有某种疾病的患者时，这些患者可能有与正常对照不同的其他症状，这样的疾病关联正在被广泛研究，我们寄希望于它们可能提供疾病的更多知识。与已知位点的等位基因关联的性状可以用来定位与疾病易感性相关的基因。但是关联并不意味着与疾病位点连锁。基于家系的检验，如TDT和S-TDT，能检测疾病和标记之间的连锁。如果这种疾病是复杂性状疾病，那么这些检验比传统的能够定位使个体易患某种疾病的基因的连锁检验方法更为有效。

主要概念

标记和等位基因

标记是指在染色体上位置已知的位点，在这个位点上，有不同的可以被该位点上的等位基因确定的基因型，标记通常是高度多态，而且等位基因的变异一般来说不会影响功能。标记可以用M表示，标记位点不同的等位基因按顺序命名（如M_1、M_2、M_3）。在当前的研究中，经常用到两种类型的标记：微卫星标记和单核苷酸多态性。微卫星标记通常是一段包含可变数目串联重复（如双核苷酸和四核苷酸）的DNA区域，它们可以通过PCR被分型。第二种高度冗余的DNA变异是单核苷酸多态性，或者说是SNP，尽管SNP通常只有两种等位基因，但是它们在基因组中广泛存在（大约每1000个核苷酸就有一个），因此它们已经成为连锁分析和关联研究的重要研究工具。

关联

如果在一个群体中，具有黑发蓝眼的个体频率与具有黑发的个体频率和蓝眼的个体频率不相匹配，那么我们就可以说在这两种性状或者表型中存在种群关联。这种关联造成的后果就是在黑发和其他发色个体中蓝眼个体的频率不尽相同。群体中 A_1B_1 配子的频率与 A_1 与 A_2 等位基因不匹配时，等位基因 A_1 和 A_2（位于位点 A）和等位基因 B_1 和 B_2（位于位点 B）之间存在关联。这种等位基因关联是一种没有特定的原因或者物理学遗传连锁的统计学概念。关联的统计学量度，通常也称为配子不平衡系数 δ，是这样定义的：

$$\delta = A_1B_1 \text{ 类型配子频率} - A_1 \text{ 的频率} \times B_1 \text{ 的频率}$$

如果 A 是疾病位点，B 是标记位点，这两个位点存在的等位基因关联意味着等位基因 B_1 的频率在患病个体（病例）和无病个体（对照）之间存在区别。在检测疾病位点和标记之间的关联时，检测这两个频率的差异远比直接检测 δ 要方便得多。

连锁

与关联不同，两个位点 A 和 B 之间的连锁是遗传学概念：两个位点如果在同一条染色体上相距很近，那么在减数分裂中，一个位点的等位基因的分离与另一个位点等位基因的分离并不是互相独立的，这样我们可以说两个位点是连锁的，我们对紧密连锁更感兴趣，因为这提示我们两个位点在染色体上相距很近。

连锁不平衡

如果 A_1 等位基因是最近通过 B_1-bearing 的染色体产生的，而且产生的时间短从而不足以消除重组对关联的消除影响，那么我们说，这两个连锁的等位基因（A 和 B）之间存在关联。在这种情况下，这两个位点处于连锁不平衡。而且连锁不平衡的强度，或者说是关联的强度，是被它们之间连锁的紧密程度制约的。然而，由于关联可以有其他原因产生，所以存在关联并不一定意味着连锁。

病例对照和基于家系的研究

病例对照研究通过使用不相关的病例和不相关的对照来研究疾病和其他性状（表型或者基因型）的关联。从比较患者和对照中标记等位基因或者基因型频率得出结论。这个程序主要依赖于配对的假设：假定这两个群体不会因为任何原因导致标记频率不同，也就是说不是疾病带来的后果。因此在各种可能产生假阳性的特性方面患者和对照匹配是至关重要的，然而，不同的种群通常会有不同的标记等位基因频率，因此配对首先要确保相同的种群背景。其他与标记等位基因频率相关的特征也比较重要，如年龄、人口统计学特征和性别分布等。而基于家系的研究则利用家系内的数据，将分析限制在家系内可以有效地避免在病例对照实验中的配对问题。

病例对照设计：基于群体样品的疾病关联

利用标记位点等位基因进行的疾病关联方法所利用的数据如表 1.7.1 所示。因为这

些数据是无关对照的个体，因此得出的结果就是群体关联，尽管没有要求并列和对照的数目相同，为了简便和便于下一步的分析，表 1.7.1 中病例和对照是相同的。如果在 M 位点有多个等位基因而只有 M_1 是我们用来检验关联的，我们可以把 M_1 之外的其他等位基因结合成 M_2。

表 1.7.1　在随机分布的无关个体（n 个患者和 n 个对照）中等位基因 M_1 和 M_2 的数目

	M_1	M_2	合计
患者	x_1	$2n-x_1$	$2n$
对照	x_2	$2n-x_2$	$2n$
合计	x_1+x_2	$4n-x_1-x_2$	$4n$

通常我们将疾病关联，尤其是有关人类白细胞抗原，作为相对风险。利用表 1.7.1 中的数据，对于与疾病关联的等位基因相对风险可以定义为 cross-product 比值：

$$等位基因相对风险 = \frac{x_1(2n-x_2)}{x_2(2n-x_1)}$$

严格来讲，如果对照选择的是未受累个体而不是从群体中随机抽取的样本，那么这个公式代表的是可能性比值，而不是相对风险。然而对于罕见疾病两者是通用的。如果患者和对照中等位基因频率相同，那么在疾病和标记之间就不存在关联，这时期望的等位基因相对风险等于 1。

例如，假设在 50 个患者中，等位基因 M_1 的次数为 80 次，等位基因 M_2 的次数为 20 次；而在 50 个正常对照中，等位基因 M_1 的次数为 55 次，等位基因 M_2 的次数为 45 次。此时等位基因相对风险$=(80\times45)/(20\times55)=3.27$。因此在疾病和等位基因 M_1 之间存在着显著的等位基因关联。

为了揭示得到的等位基因相对风险的值，检验其统计学显著性是必要的。这可以通过计算相对风险的 95%置信区间，或者更精确一些，用表 1.7.1 中的数据进行标准的卡方检验。这被称为群体偶然性统计量（population-based contingency statistic, PBCS），表示为：

$$\mathrm{PBCS} = \frac{4n(x_1-x_2)^2}{[(x_1+x_2)(4n-x_1-x_2)]}$$

利用这个统计量通过观察到的关联去推断连锁依赖于患者和对照是否匹配。然而除了不能很好的匹配之外，还有一种方法可以导致疾病关联的假阳性（那就是存在连锁的情况下）：差别可能由于群体结构而产生。

群体结构

种群结构是对于混合、分层及遗传异质性的总体描述，反映种群内随机婚配的偏离。为了评价种群结构对能评价连锁和关联的统计量的影响，需要建立一个包含所有与基因和种群相关特性的模式。在上面讨论的经典的种群关联研究上，对于疾病的基因位点的可能性还不是很明确。某个基因是不是疾病的致病基因还不甚明了。为了分析种群结构的作用，疾病位点 D 和标记位点 M 之间的关系一定要明确。为了简便起见，我们假定一个疾病位点包括等位基因 D 和 d，而且只有 DD 基因型的个体患病（如这种疾病是隐性的），而且所有 DD 型的个体都如此（如这种疾病是完全外显）。这些假设不是必

要条件，但是它们可以简化数学分析。此外，标记位点只有两种等位基因 M_1 和 M_2，M 和 D 位点之间的重组率为 θ。

在第 0 代，个体被假定生活在 s 个亚种群的群体中，这些亚种群的大小分别是 α_1、α_2、…、α_s。在 i 亚种群中，D 的频率记作 p_i，M_1 的频率记作 q_1，配子不平衡系数记作 δ_i。

随后这些亚种群的后代迁移到了一个共同的区域，在这里他们随机婚配而不管他们的亚种群的起源如何。当然，在真正的种群中，混合不可能这么极端。这个模式的关键在于阐明在第 0 代时还较难检测到的种群结构是如何影响到根据第 1 代和第 2 代的数据得出的关联结论的。

种群结构的效果可以通过考虑 x_1-x_2 的均值来显示，x_1-x_2 的平方在种群关联检验统计量中会用到。如果所应用的数据是从上述模式中第 2 代的个体中得到的，那么对于隐性疾病，有

$$\text{mean}(x_1-x_2)=2n\left(\frac{[\sum\alpha_i p_i^2 q_i]-q[\sum\alpha_i p_i^2]}{\sum\alpha_i p_i^2}\right)+2n\left(\frac{(1-\theta)\sum\alpha_i p_i\delta_i}{\sum\alpha_i p_i^2}\right)$$

式中的总和是针对所有亚种群的。在这个公式里，第一个名词没有包含 δ_i，因此这个名词代表的关联是由于种群结构产生的。

在检验关联时，有三种策略可以处理种群结构的问题。第一种是基因组对照，在种群结构存在的情况下，可以检验候选标记或者是不连锁的标记的统计量，因此通过对同一批患者和对照的不连锁的标记进行基因分型，由于种群结构的影响导致统计量的增加可以预测到并且考虑进来。第二种方法是结构关联，它假定种群是由数目未知的同质亚种群组成。第三种方法是使用家系数据。这些方法是基于等位基因从父母到后代的传递，因此种群结构已经不再是一个瓶颈。

基于家系的关联检验和单体型相对风险

对于家系数据，与种群相对风险相对应的是等位基因相对风险。在每一个核心家系中，父母亲和患病儿童在标记处的基因型可以获得。每一个受累个体的父母有一个传递的等位基因和一个未传递的等位基因。使用的数据是在传递的和未传递的类别中 M_1 和 M_2 等位基因的数目，如表 1.7.2 所示。这里，w 是父母亲等位基因中传递到后代中的 M_1 的数目，y 是没有传递到后代中的 M_1 的数目。

单体型相对风险定义为：

$$\text{单体型相对风险}=\frac{w(2n-y)}{y(2n-w)}$$

表 1.7.2 n 个患儿其父母的 $2n$ 个传递与 $2n$ 个未传递等位基因中 M_1 和 M_2 的分布[a]

	M_1	M_2	合计
传递	w	$2n-w$	$2n$
未传递	y	$2n-y$	$2n$
合计	$w+y$	$4n-w-y$	$4n$

a 引自 Spielman et al.（1993）。

相似地，利用表1.7.2中的数据检验关联的自然统计量是通过种群偶然统计量所定义的PBCS来确定的。这个统计量将w（传递到受累后代中的M_1等位基因的数目）与y（未传递的M_1等位基因的数目）称为AFBAC（affected family-based controls，受累的家系对照）

$$\mathrm{AFBAC}=\frac{4n(w-y)^2}{[(w+y)(4n-w-y)]}$$

一方面，通过种群相关风险和种群偶然性检验统计量类比；另一方面家系单体型相对风险和AFBAC统计量相类比，这样的分析已经全面了。

基于家系的连锁检验：TDT

当前研究的目标是定位疾病基因，因此设计一种能特异检测连锁而且不会受到种群结构影响的检验方法是我们迫切需要的。现在我们能够通过类似于表1.7.2中分析关联的数据来进行了。然而，为了检测连锁，需要把表1.7.2中的数据改写成表1.7.3中的数据，这个表中的数据提供了四种类别：a是M_1M_1型父母传递给受累后代M_1等位基因的数目；b是M_1M_2型父母传递给受累后代M_1等位基因的数目；c是M_1M_2型父母传递给受累后代M_2等位基因的数目；d是M_2M_2型父母传递给受累后代M_2等位基因的数目。

表1.7.3　n个患儿的$2n$个父母中传递与未传递的等位基因M_1和M_2[a]

传递的等位基因	未传递的等位基因		
	M_1	M_2	合计
M_1	a	b	$a+b$
M_2	c	d	$c+d$
合计	$a+c$	$b+d$	$2n$

a　引自Spielman et al.（1993）。

表1.7.2中的数据和表1.7.3中的数据是通过这样的共识联系的：$w=a+b$，$y=a+c$。这就使得我们可以用a、b、c和d将AFBAC统计量改写成：

$$\mathrm{AFBAC}=\frac{4n(b-c)^2}{[(2a+b+c)(b+c+2d)]}$$

这个统计量不是为了检验疾病基因和标记之间的连锁。用来检验连锁的是传递不平衡统计量（TDT），这个统计量也可以从表1.7.3中的数据计算出：

$$\mathrm{TDT}=\frac{(b-c)^2}{(b+c)}$$

当疾病基因和标记不连锁时，这个TDT统计量可以认为是自由度为1的卡方分布，因此可以通过自由度1的卡方表得出。它仅仅利用表1.7.3中的b和c，这也是我们所希望的，因为这些数据是从杂合子父母中得到的，而且只有杂合子父母能提供有关连锁的证据。

可靠性：与种群相对风险检验相比

TDT检验可以有效地检验连锁而不管种群结构如何。而且，不管是对于简单家系

(只有一个受累后代)，还是复杂家系（两个或两个以上受累后代）或者是两者都有的家系，甚至是多代家系都可以用 TDT 来检验连锁。这可以通过与种群相对风险检验对比得出结论。1～72 页的公式是种群关联统计量中的 $x_1 - x_2$ 的均值，它是假定感兴趣的疾病是隐性疾病而且样品是由于混合而产生了种群结构的。在计算统计量 TDT 时的 $b-c$的平均值是：

$$\text{mean}(b-c) = 2n\frac{(1-2\theta)[\sum \alpha_i p_i \delta_i]}{\sum \alpha_i p_i^2}$$

这个公式至少反映了 TDT 的两个重要特性。第一，与种群相对风险检验统计量的均值不同，TDT 统计量的均值没有一个术语来代表由于混合（这是在种群相对风险统计量中得第一个术语）而引起的关联，这也确保了 TDT 在结构群体中依然有效；第二，与种群相对风险统计量中的第二个术语不同，它的值在 $\theta=1/2$ 时为 0（如当疾病和标记不连锁时）。这确保了 TDT 能有效检验连锁而种群偶然性检验不是。而且它与种群相对风险统计量的第二个术语在 $\theta=0$ 时是相同的。这就提示种群相对风险统计量是检验由于种群结构引起假关联的方法的一部分，第二部分在重组率很小以至于可以忽略的时候就是 TDT 统计量。

效力：与其他检验连锁的方法进行比较

在疾病基因和标记之间存在关联对于使用 TDT 是至关重要的，如果没有关联存在，那么 TDT 无法检验连锁。这样，与那些不依赖于连锁而检验关联的统计量相比，尤其是那些依赖于受累同胞对等位基因共享的检验就显得比较重要了，对于简单疾病，共享方法可能在提示连锁方面更好，但是对于复杂疾病，我们更倾向于使用 TDT。

其他需要考虑的方面

遗传模式

尽管 TDT 是在隐性疾病的模式下提出的，而且 TDT 统计量中的表达都是基于这一假设，然而，TDT 对于其他模式依然有效。

分离偏离

如果 TDT 检测到了在杂合子父母中有过多的 M_1 等位基因的传递，就表明有连锁的证据。然而，从原理来看，这可能由于减数分裂过程导致的优势传递现象。这个现象也称为分离偏离，将会导致向受累和不受累后代传递更多的 M_1 等位基因。这可以通过检验从杂合子父母传递给未受累后代（尤其是受累个体的同胞）的 M_1 等位基因的情况来得出。如果没有在未受累同胞中监测到多余的 M_1 等位基因的传递，就说明没有分离偏离，也就没有必要检验了。如果检测到了多余等位基因传递，那么我们就需要一个 two-by-two 偶然性卡方检验来判断在受累和未受累同胞中有无 M_1 等位基因的传递差别。

不完全的基因型数据

考虑下面的例子：在 M 位点只有两个等位基因，而且能够得到的父母是有信息含

量的杂合子 M_1M_2。如果后代基因型是 M_1M_1，那么很明显是这种杂合子父母传递的 M_1 等位基因。同样如果后代是 M_2M_2，也是这种父母传递的 M_2 等位基因。因此即使这种家系不全的数据也可以应用。然而，如果后代是杂合子，我们不可能从可以得到的父母基因型数据推断哪个等位基因是从他们传递来的。因此这样的数据就要丢弃。如何使用由信息含量的家系和丢弃物信息含量的家系将导致 TDT 的偏差。在无效假设的情况下，M_1 和 M_2 是同等的被可得到的父母传递的，但是如果在种群中的 M_1 频率增加，那么 M_1 等位基因是从没有得到基因型数据的父母传递来的可能性就会增加，这种情况发生时，如果传递了 M_1 等位基因 M_1M_2 父母的数据就会被利用，相反，如果传递了 M_2 等位基因，就会被舍弃。这样的后果就是 M_1 等位基因在种群中的频率越大，从杂合子父母传递 M_1 的可能性就越大，出现这种情况的家系是那些在可获得父母中的等位基因是纯合或杂合的后代。然而，如果后代中有一个等位基因（如 M_3）在可以获得的父母基因型数据中不存在，那么我们就可以使用这些数据而不用舍弃，同时也不会发生偏差。

重建父母基因型

在父母基因型无法得到的情况下，我们可以使用可以重建基因型的家系中从后代的基因型推出父母的基因型，然后进行 TDT 检验。然而这个策略不是很有限，既然只有具有一定基因型后代的家系才能推断父母基因型，那么，从可能的父母基因型数据得出的结果会发生偏离。

基于家系的关联检验——TDT

TDT 检验可以利用合适的数据进行关联检验，即便在分离的群体中也是如此。当我们可以利用复杂家系中的数据进行连锁检验的时候，只有一个受累患者的复杂家系中的数据就可以用来进行关联分析。TDT 程序假定标记等位基因从父母传递到两个或更多受累后代是在自由传递的，无效假设是当 TDT 被用来进行连锁检验这样的条件下。然而当 TDT 被用来进行关联分析时，这个条件并不是必需的。在第二种情况下，即使在没有种群关联的无效假设之下，传递到两个受累后代的优势并不独立，尤其是当疾病和标记连锁的情况下。

AFBAC 统计量 1～74 页也被证明可以用来进行关联检验。与 TDT 相比，它只能利用简单家系中的数据。甚至当时用简单家系的数据时，这个统计量在只有父母种群是处于 Hardy-Weinberg 平衡的无效假设下是服从卡方分布的。在一个有种群结构的群体中这是不可能的。因此，这个统计量在拒绝无效假设方面没有 TDT 那么有效。

TDT 的推广——多于两个等位基因

在以上的讨论中我们假定只有两个等位基因，M_1 和 M_2。实际上，这是不可能的，而且上面描述的程序可以用来扩展到任意数目等位基因的情况。与只有两个等位基因的情况相比，这些程序是相当复杂的。

需要分析的数据如表 1.7.4 所示，它来自于表 1.7.3 的两等位基因，而且描述了在没一个传递或者不传递的类别中受累儿童的父母的数目。显然，由于标记等位基因的数

目很大，我们需要一个比表 1.7.3 中的注释还要复杂的注释。而且为了与表 1.7.3 中的对应，这里的父母总数也是 $2n$。

表 1.7.4　在 n 个受累患者的 $2n$ 个父母中传递的和未传递等位基因 M_1，M_2，…，M_k 的组合

传递的等位基因	未传递的等位基因				
	M_1	M_2	…	M_k	合计
M_1	n_{11}	n_{12}	…	n_{1k}	$n_{1.}$
M_2	n_{21}	n_{22}	…	n_{2k}	$n_{2.}$
…	…	…	…	…	…
M_k	n_{k1}	n_{k2}	…	n_{kk}	$n_{k.}$
合计	$n_{.1}$	$n_{.2}$	…	$n_{.k}$	$2n$

多等位基因的连锁检验

疾病和标记位点不连锁的无效假设对于表 1.7.4 中的数据意味着，对于所有的（i，j）组合 n_{ji} 的均值与 n_{ij} 的均值相同。因此一个能够用来检验标记和疾病之间连锁的有无连锁的方法是检验表 1.7.4 中数据的对称性。然而，由于有 k 个等位基因，因此这个检验的自由度是 $k(k-1)/2$，同时该检验也增加了“淹没”效应：一个或几个强效等位基因的作用在一个包括很多没有效应或者很少效应的等位基因的 global 检验里可能检测不到。因此，总体上这类检验不应该利用。

在简化的下一步，表 1.7.4 中的行和列的数据就被用来进行连锁检验。在一个杂合子父母的基因型包含 M_i 的种群中，这些检验比较传递的 M_i 等位基因的数目和非 M_i 等位基因的数目。这些检验的理论基础在于：如果无效假设是真的，那么对于所有的 i，$n_{i.}$ 的均值等于 $n_{.i}$ 的均值，同时这些检验也能检验这两个均值的相等性。

一个利用这个理论的检验是 generalized TDT（GTDT）统计量。使用这个检验时，我们首先根据 $d_i = n_{i.} - n_{.i}$ 计算 d_i 的值。这些值的总和必定为零，因此在没有丢失信息的前提下我们可以随意选择标记等位基因同时形成一个 $\boldsymbol{d}'$ 向量：

$$\boldsymbol{d}' = (d_1, d_2, \cdots, d_{k-1})$$

如果疾病和标记位点不连锁的无效假设是真的，那么预测的 d_i 的方差是 $n_{i.} + n_{.i} - 2n_{ii}$，$d_i$ 和 d_j 之间的协方差是 $-(n_{ij} + n_{ji})$。这些预测的方差和协方差组成一个矩阵 $\mathbf{V}$，这样，GTDT 统计量也可以这样计算：

$$\text{GTDT} = \boldsymbol{d}'\mathbf{V}^{-1}\boldsymbol{d}$$

在无效假设情况下，GTDT 统计量为一个自由度为 $k-1$ 的渐进卡方分布。因此可以通过参考卡方分布的显著性表与观察值来检验连锁。

尽管 GTDT 统计量是最自然的 TDT 统计量的产物，但是它需要转化一个大的矩阵。一个与 GTDT 相似并且不需要转化矩阵的统计被定义为 T_{mhet}：

$$T_{\text{mhet}} = [(k-1)/k]\sum_i \left[\frac{(n_{i.} - n_{.i})^2}{(n_{i.} + n_{.i} - 2n_{ii})}\right]$$

在一个不分层的种群中，这个统计量在无效假设情况下近似于自由度为 $k-1$ 的卡方分布，而且，与 GTDT 统计量相同，当 $k=2$ 时，这个统计量变成了双等位基因的 TDT 检验。

另一种非常不同的检验，叫 maxTDT，它的焦点在于最有显著性的等位基因而不是全部等位基因。对于每一个 i（$i=1, 2, \cdots, k$），所有非 i 的等位基因组成一个集合，因此就可以用双等位基因的 TDT 统计量了，这样就会得到 k 个不同的 TDT 统计量。其中最大的一个（也就是 maxTDT）就用来进行检验。在表 1.7.4 的条目中，maxTDT 统计量是多种可能的双等位基因 TDT 统计量中最大的一个（当 i 分别取 1，2，…，k 时）：

$$\frac{(n_{i.}-n_{.i})^2}{(n_{i.}+n_{.i}-2n_{ii})}$$

当 $k=2$ 时这个统计量也变成了 TDT 统计量。maxTDT 自由度是 1，因此在最大程度上避免了“淹没”效应。但是我们又不能利用卡方检验去检验它的显著性。因为这个有意选择的最大 TDT 统计量不服从卡方分布。通过模拟研究已经找到了 maxTDT 统计量的显著性点，显著性值见表 1.7.5。

表 1.7.5 通过模拟研究得出的 maxTDT 统计量的显著性点

k	Ⅰ型错误			
	5%	1%	0.1%	0.01%
2	3.84	6.64	10.83	15.13
3	5.49	8.46	12.70	17.39
4	6.10	9.10	13.49	18.03
5	6.51	9.51	13.78	18.26
6	6.88	9.87	14.21	18.55
7	7.15	10.15	14.48	18.68
8	7.41	10.38	14.74	19.02
9	7.61	10.60	14.87	19.33
10	7.82	10.81	15.10	19.51
11	7.99	11.01	15.39	19.86
12	8.15	11.17	15.51	20.14

多等位基因的关联检验

与上面讨论的相似，双等位基因的 TDT 统计量也可以用来进行关联检验。与 TDT 检验相同，如果分析中使用的家系只有一个受累同胞，GDTDT 统计量、T_{mhet} 和 maxT-DT 也可以进行关联检验。

利用标记单体型检验关联

传统上，关联检验时独立检验每个标记位点的单位点检验。已经有几个检验利用多个标记位点等位基因组成的标记单体型来检验关联。这些检验在疾病状态和一个特定组合或者不同位点等位基因的组合检验关联。从直观上看来，我们可以期望标记单体型能提供比单个标记更多的信息。我们通常认为关联是由于易感基因存在于一个或者几个祖先单体型上。易感等位基因和特定的标记等位基因或者单体型之间关联的强度依赖于关联等位基因或者单体型的频率。当在种群中阳性关联的等位基因或者单体型频率很低时，就会发现较强的关联。单体型必定比单体型中每个等位基因的频率低。因此在检查单体型时就有一个更大的关联潜能。在检验单体型中的一个困难是单体型一般很难直接

观察到，而是我们通常有个体基因型的信息。在有些情况下，单体型可以从基因型数据中推出，但是当个体在多个位点是杂合子，那么单体型的分布就模棱两可。家系成员的基因型数据可以辅助进行单体型推断。单体型关联检验的另一个困难在于我们没有优先的知识关于哪个单体型可能与疾病关联，而且可能会有多个标记或者多个等位基因的单体型需要我们去考虑。低频率的单体型对于分析能贡献小数目的OBSERVATION。通常情况下，少数目的单体型可以集合起来提供渐进的检验，但是如果阳性和阴性关联单体型都集合起来，那么就会降低检验效力。代表性的GLOBAL检验和个体单体型检验用来检验。我们应该考虑多重检验来解释对于个体单体型的多个检验结果。

同胞TDT（S-TDT）

上面讲述的TDT利用父亲、母亲和受累后代基因型都已知的家系数据，然而当疾病是成年发病或者老年发病时，我们可能很难获得受累患者父母亲的标记基因型。这就限制了TDT的应用。同胞TDT（S-TDT）方法通过利用未受累同胞的基因型代替父母基因型解决了这一难题。因此可以利用没有父母亲的同胞进行TDT分析。这个TDT的扩展方法对于研究晚期发病型疾病特别有用，如2型糖尿病、心血管疾病、老年痴呆病及其他与老年相关的疾病。适合于进行S-TDT分析的同胞基因型数据需要符合两个标准。第一，同胞对中至少要有一个受累的和一个正常的；第二，同胞中不能都具有相同的基因型：一个有不同标记基因型的同胞对（最小的同胞对）能满足这个标准。需要观察的数据是后代（包括每个家系中的受累和正常后代）的标记基因型。

本质上，S-TDT检验标记基因频率在受累后代中是否显著区别于正常同胞。因为在患者和正常间的对比是在家系间进行的，因此没有连锁的疾病关联不会导致这些区别于随机样本效应不同，标记等位基因的频率在患者和正常同胞中是相同的，除非存在连锁（包括标记本身也连锁）。因此S-TDT的无效假设是疾病和标记不连锁。

考虑一个有a个患者和u个正常同胞的家系，总数$t=a+u$。假设在这个同胞对中，基因型为M_1M_1的同胞数为r，M_1M_2基因型的同胞数为s，这样M_2M_2型同胞就是$t-r-s$。我们假定所有标记基因型只有三种：M_1M_1、M_1M_2、M_2M_2。我们的目的是检验在这个家系中某一个特定的等位基因，如M_1是否在患者中出现频率具有显著性。如果假设是正确的话，那么具有基因型M_1M_1、M_1M_2的患者的数目就服从超几何分布。因此我们可以计算均值：

$$(2r+s)a/t$$

对于这个家系中受累同胞中等位基因M_1的数目，可以用下面公式计算方差：

$$au\{4r(t-r-s)+s(t-s)\}/\{t^2(t-1)\}$$

将数据中每一个家系都考虑在内，通过简单累积计算在整个数据中受累同胞等位基因M_1数目的整个无效假设均值A和方差V：

$$A=\sum(2r+s)a/t$$

$$V=\sum au\left\{\frac{4r(t-r-s)+s(t-s)}{t^2(t-1)}\right\}$$

在所有情况中，累积是对于样本中的所有家系而言的。

这样显著性检验就可以通过利用A和V，以及在受累同胞中观察到的M_1等位基因

的数目 Y，计算出

$$z=\frac{Y-A}{\sqrt{V}}$$

是用近似的正态分布可以从 z 值计算出一个大约的 p 值。习惯上进行连续校正后，p 值就从这个公式计算出来了：

$$z'=\frac{|Y-A|-\frac{1}{2}}{\sqrt{V}}$$

因为这个计算是从家系内的均值和方差计算出来的，然后将所有家系的 A 和 V 总计起来得到一个全面的 A 和 V，因此种群结构带来的潜在问题就被消除了，这样计算出来的也就是原始的 TDT。

举个例子，考虑表 1.7.6 所示的家系数据。这里 $r=4$，$s=2$，$a=5$，$t=9$。这个家系对全面 A 的贡献是 $(8+2)\times5/9=5.56$，对全面方差 V 的贡献是 $5\times4\times(48+14)/648=1.91$。

表 1.7.6 对于 S-TDT 的简单家系数据

	携带各基因型的同胞数			
	M_1M_1	M_1M_2	M_2M_2	合计
受累	3	0	2	5
未受累	1	2	1	4
合计	4	2	3	9

将 TDT 和 S-TDT 结合起来进行一个全面的检验

在一个单独收集的家系中，可能有的适合用 TDT，而有的适合用 S-TDT 分析。这里我们将要说明对于这样的情况，怎样利用所有家系的数据用一个全面的程序在存在关联的情况下检验连锁。

首先考虑只有两个等位基因 M_1 和 M_2 的情况。对于检验中使用的任一家系，必须要有家系中一个患者的基因型，而且，根据其他家系成员要分成三个组。

1. 父母亲的基因型可以获得，但是未受累的同胞没有。

2. 至少可以获得一个未受累同胞，但是父母亲基因型未知。

3. 父母基因型已知，而且至少一个未受累同胞已知。

第 3 组的家系符合 TDT 和 S-TDT 检验的要求。最近研究表明，在足够多的样本中，在两种检验都可以使用的情况下，TDT 的效力至少可以和 S-TDT 相同。因此我们将第 3 组的家系和第 1 组的家系结合起来并且忽略第 3 组中的未受累同胞，这里的“第 1 组”因此就是指这个结合的家系。

如果只分析第 1 组的数据，相关的 TDT 就给出了。然而对于我们当前的目的来说，使用这个组中从杂合子 M_1M_2 父母传递给受累后代的 $b+c$ 个等位基因中传递的 M_1 的数目 X 作为一个统计量将更方便而且等效。当标记和疾病不连锁时，X 服从均值是 $(b+c)/2$ 和方差是 $(b+c)/4$ 的二项式分布。

S-TDT 适合于第 2 组的家系。上面已经讨论过，它的检验统计量是在受累同胞中

M_1 等位基因的数目 Y。当标记和基因不连锁时，Y 服从均值为 A 和方差为 V 的分布。

当第 1 组和第 2 组中的数据都可以得到时，就有一个天然的检验统计量 W，也就是 X 和 Y 的总和。在标记和疾病不连锁的无效假设情况下，W 的均值是 A_{comb}，方差是 V_{comb}：

$$A_{\text{comb}} = \frac{b+c}{2} + A$$

$$V_{\text{comb}} = \frac{b+c}{4} + V$$

这时，显著性检验就可以利用 z'统计量（经过连续校正），从下面公式计算：

$$z' = \frac{|W - A_{\text{comb}}| - \frac{1}{2}}{\sqrt{V_{\text{comb}}}}$$

如果根据标准 z 值表，z'的值偏离 0 很远，那么就拒绝疾病和标记不连锁的无效假设。

举个应用结合程序的例子，假设第 1 组的家系中杂合子父母传递的 $b+c$ 的总数是 300，其中有 166 个是 M_1 等位基因。进一步，我们假设第 2 组家系的受累同胞中有 215 个 M_1 等位基因，而且从公式 1.7.16 和 1.7.17 计算出的 A 和 V 分别是 197.4 和 188.6，那么 $W=166+215=381$。

在无效假设下，从 M_1M_2 父母传递的 M_1 等位基因的平均值是 150，方差是 75，那么 $A_{\text{comb}}=150+197.4$，$V_{\text{comb}}=75+188.6=263.6$。从公式 1.7.21 计算出的 z'就等于：

$$\frac{|381 - 347.4| - \frac{1}{2}}{\sqrt{263.6}}$$

作为一个在 5%的显著性水平上的双侧检验，是显著的。更多的例子可以参考 Spielman 和 Ewens（1998）的论著。

TDT、S-TDT 及结合的检验程序可以从 http://genomics.med.upenn.edu/spielman/TDT.htm 得到。

S-TDT 作为关联检验的有效性

上面提到的 S-TDT 是用来检验标记和疾病之间的连锁的一种检验方法。然而 TDT 也可以进行关联检验的充分必要条件是：数据是从简单家系中得到的（一个受累后代、一个或者两个父母在标记处都是杂合子）。S-TDT 可以进行关联检验的充分必要要求是家系数据要包括一个“最小 S-TDT 配置”：每个家系包括一个受累和一个正常同胞，这两个同胞具有不同的标记基因型。

多等位基因

当标记位点有 k 个等位基因，maxTDT 和 GTDT 统计量就是推广的 TDT（none of special interest）。对于受累和正常同胞形成一个核心的家系数据，就可以用类似的 S-TDT 程序：maxTDT。对于等位基因 M_1，其他所有等位基因都成为一个“非 M_1”的组，就可以得到在受累同胞中的 M_1 等位基因的数目，然后就可以使用与 A 和 V 相似

的方程式来计算 z 值。一个相似的程序就对 k 个等位基因分别计算 z 值，将每个 z 值取平方，最大的一个与表 1.7.5 中比较进行显著性检验。这种方法就叫做 maxTDT。我们可以用一个平行的程序进行结合检验。我们根据与 A_{comb} 和 V_{comb} 相似的程序计算出 k 个同步等位基因的 z 值。同样地，将每个 z 值平方后与表 1.7.5 中的数据进行比较。第二种方法有两个缺点。第一对于 GTDT，一个或几个有显著效应的标记等位基因的作用可能被很多没有或者很少关联作用的等位基因所掩盖。第二，怎样将 S-TDT 同 GT-DT 结合起来还存在一定问题。由于这些原因，我们推荐使用 maxTDT 方法。

家系

第二个 TDT 和 S-TDT 共有的特性是考虑包含几个同胞群的家系，如两个同胞群中的表亲集合，或者是同胞和他们的阿姨/叔叔。在这样的家系中使用所有杂合子父母和他们的后代数据时，TDT 可以有效地检验连锁，但是不能检验关联。这样对 S-TDT 造成的后果就是从分离的同胞群中得到的数据可以结合起来进行连锁检验，但是不能进行关联检验。

困难在于当存在连锁，甚至没有等位基因关联的无效假设是正确时，多个核心家系或者同胞群对统计量的贡献并不是独立的。因此，像 TDT 和 S-TDT 这样独立检验核心家系或者同胞群的检验是无效的，如它们不会有正确的显著性水平。

对于精细定位和候选基因研究，确定连锁不平衡是合乎需要的。因此，已经有在扩展家系中进行连锁和关联检验的检验方法了。一个这样的检验方法是家系不平衡检验（pedigree disequilibrium test，PDT，软件可以在 http://wwwchg.mc.duke.edu/software 下载）。这个检验能够正确的解释在疾病和标记位点存在连锁的家系之间的关系。这个检验统计量都有以下形式：

$$T = \frac{\left(\sum_{i=1}^{N} X_i\right)^2}{\sum_{i=1}^{N} X_i^2}$$

式中，X_i 衡量第 i 个家系的关联，$i=1$，…，N，无效假设是均值为零。这个统计量的不同之处在于它是以家系来衡量关联的。

参考文献：Abecasis et al.，2000；Nelson et al.，2001；Pritchard et al.，2000；Rabinowitz and Laird，2000；Ritchie et al.，2001

编者：Warren J. Ewens，Richard S. Spielman，Norman L. Kaplan，and Eden R. Martin

单元 1.8 基因-基因相互作用的分析

本单元的目的在于介绍寻找疾病易感基因过程中作为有意义的复杂因子出现的基因-基因互作或上位作用。教科书上通常将上位作用定义为一个基因对另一基因效应的遮盖作用。一个经典的生物学上位作用的例子（即有生物学基础的基因-基因交互作用）来自于对 shepard's purse plant 单树杂交产生种皮形状的研究（图 1.8.1）。双杂合子植

株杂交产生的心形种皮对椭圆形种皮的孟德尔比是 15∶1。普遍认为两个基因座有显性基因就可产生心形种皮。而只有两个基因座上都是隐性等位基因时才产生椭圆形种皮。这是一个隐性-隐性相互作用的例子，因为两个基因座都携带有隐性基因型时所产生的表型不同于只有一个基因座携带有隐性基因型时产生的表型。

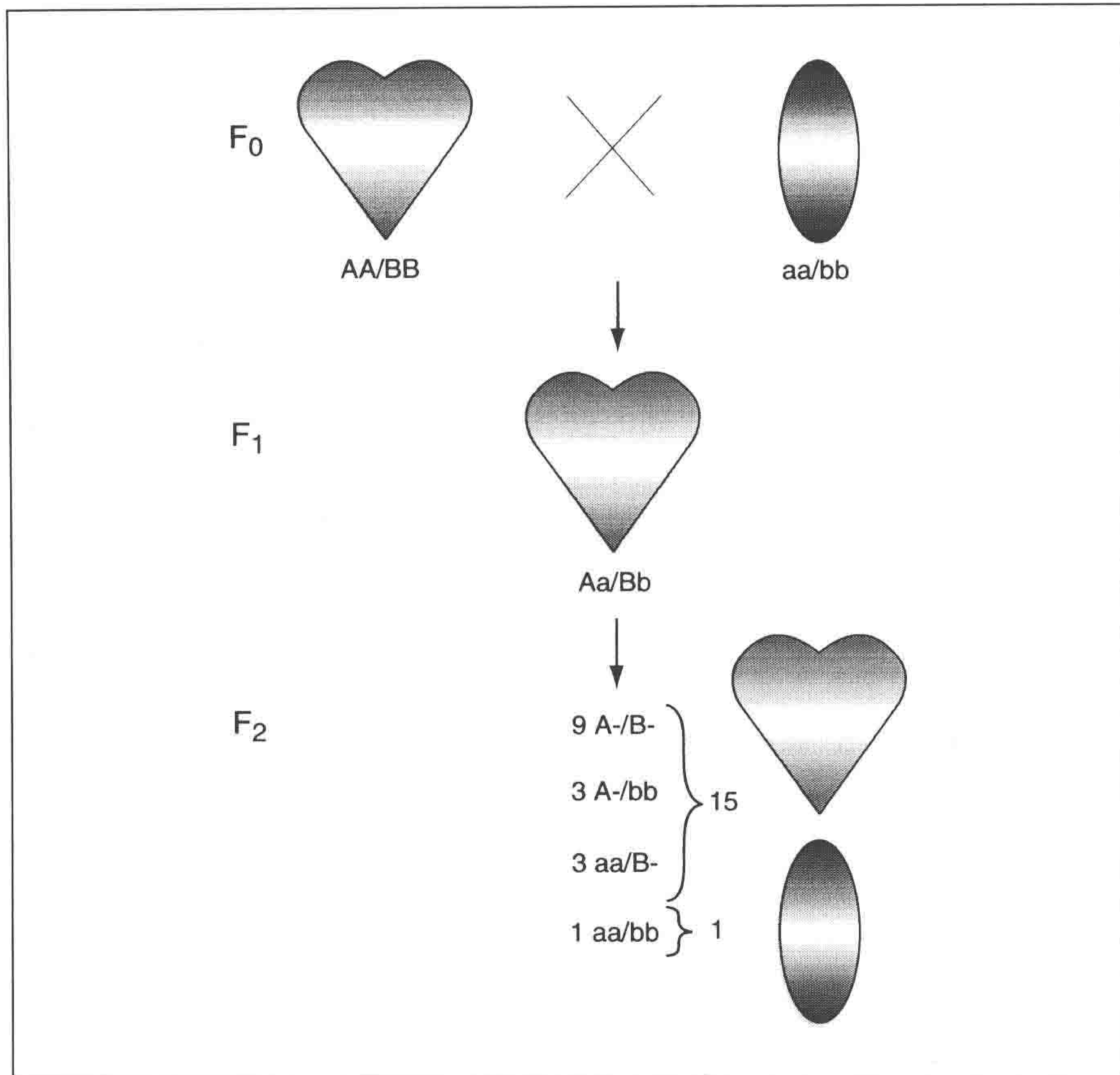


图 1.8.1 shepard's purse plant F_1 代杂交产生心形和椭圆形种子的表型比为 15∶1。被描述的两个基因座 A 和 B，每个都对应两个等位基因（A 或 a、B 或 b）。只有 a 和 b 等位基因都处于纯合状态的植物才产生椭圆形种子。这是一个隐性-隐性上位作用的例子。

表 1.8.1 示一个以外显率函数形式表示的统计学上位作用（或 epistacy）的简单例子。外显率函数简单地说就是，从多对基因座（即，P［D｜G］）给定一个特殊的基因型或基因型组合（G）时单个个体有端点（D）的可能性（P）。表 1.8.1 显示针对患病危险度，两个单核苷酸多态性（SNP）相关的外显率函数，每个 SNP 有两个等位基因和三种基因型。在本例中，每个等位基因的生物学群体频率为 $p=q=0.5$，AA 和 BB 的基因型频率为 p^2，Aa 和 Bb 的基因型频率为 $2pq$，aa 和 bb 的基因型频率为 q^2，符合哈迪-温伯格平衡（Hardy-Weinberg equilibrium）。因此，假定 AA 的基因型频率为 0.25，Aa 的基因型频率为 0.5，aa 的基因型频率为 0.25，那么 BB 的边缘外显率（即仅考虑 BB 基因型对患病风险的影响）可通过下式计算得出(0.25×0)+(0.5×0)+

(0.25×1)=0.25。这表示在不考虑其他遗传变异基因型，且给定 BB 基因型的情况下，患病的可能性是 0.25。同样地，Bb 的边缘外显率可通过下式计算得出(0.25×0)+(0.5×0.5)+(0.25×0)=0.25。注意该模型，所有的边缘外显率值（即给定某一基因型且不依赖于其他基因型时，患病的可能性）均相等，这表明不存在主效应（即这些遗传变异不能单独地影响患病风险），尽管 table penetrance 值不相等。这里，由于遗传了两个高危等位基因（如 a 和 b 被确定为高危因子）患病风险将大大提高。

表 1.8.1 缺乏独立的主效应时，两个存在交互作用的 SNP 不同基因型组合的外显率值

	表外显率			边缘外显率
	AA (0.25)	Aa (0.50)	aa (0.25)	
BB (0.25)	0	0	1	0.25
Bb (0.50)	0	0.5	0	0.25
bb (0.25)	1	0	0	0.25
外缘外显率	0.25	0.25	0.25	

采用传统的参数统计学方法，如直线回归和 logistic 回归，很难检测出上位作用并描绘其特性，因为当维数很高时数据缺乏。也就是，当考虑到多个多态性之间相互作用时，多数多位点的基因型组合的数据点很少甚至没有。例如，两个 SNP，且每个 SNP 都存在有三种基因型，那么就有 9 种双位点基因型组合（表 1.8.1）。三个 SNP 时，则有 27 种双位点基因型组合。因此，每多考虑一个 SNP，多位点的基因型组合数就呈指数增长。维数的增加将导致所需样本量呈指数增长，这样才有足够的数据用来评估相互作用。

离散性状关联分析中检测基因-基因交互作用的方法

logistic 回归模型

logistic 回归可将发病概率（p）作为一个自变量的线形函数予以模型化。对 p 进行 logit 转换，$\ln[p/(1-p)]$，采用该方法可阻止 p 取值<0 或>1。当以指数形式来表达线性函数时，p 可以表达为 $p=(e^{\alpha+\beta X})/(1+e^{\alpha+\beta X})$，此处 α 和 β 为回归系数（即参数）且 X 为自变量。对于一个离散型自变量如多态，比值比可将基因型和发病概率联系起来，比值比可由 e^{β} 算出。两个多态的独立主效应，A 和 B，可以表达为 $p=(e^{\alpha+\beta}1^{A+\beta}2^{B})/(1+e^{\alpha+\beta}1^{A+\beta}2^{B})$。$A$ 和 B 之间的交互作用可以通过在公式中增加 β_3AB 这一乘积项形式来表达。通过检验 β_3 是否等于 0，可对“不存在交互作用”这一无效假设进行检验。拒绝无效假设则为交互作用的倍增提供了证据。logistic 回归的优势在于建立交互作用的模型相对容易，统计学理论已非常清楚，利用各种免费获取或购买的统计软件包在一台标准桌上型电脑上即可完成建模。如上所述，当存在多个自变量时，需要很大的样本量才能准确计算出模型中的参数，这是 logistic 回归的一个重要缺点。

一些免费的利用 logistic 回归模型的计算机程序有助于评估基因-基因交互作用研究计划的检出效力。在双基因座交互作用的分层和病例-对照研究中，Power (http://dceg.cancer.gov/POWER/) 这一程序可评估样本量和效力。另一程序 Quanto(http://hydra.usc.edu/gxe/)则可在配对的病例-对照、病例-同胞、病例-双亲以及单个病例研

究中用于评估样本量和效力。

多因子降维法

在流行病学研究中，多因子降维法（multifactor dimensionality reduction，MDR）相比 logistic 回归可以更好地分析基因-基因交互作用。该方法无参数，无遗传模式的设置。图 1.8.2 说明了 MDR 的操作方法。第一步，数据被分为训练集（如数据的 9/10）和一个独立的测试集（如数据的 1/10），以便进行交互验证。第二步，选择 n 个遗传和（或）环境因子。在 n 维空间中有 n 个因子和其相对应的多因子集合。例如，各具有三种基因型的两个基因座，可能有 9 种两个基因座基因型的结合。我们就可以在多因子集合中，计算病例与对照数目的比例。如果该比例不超过规定的阈值（如≥1），n 维空间中的每个多因子集合将被标为“高危”；相反，如果该比例超过规定的阈值，每个多因

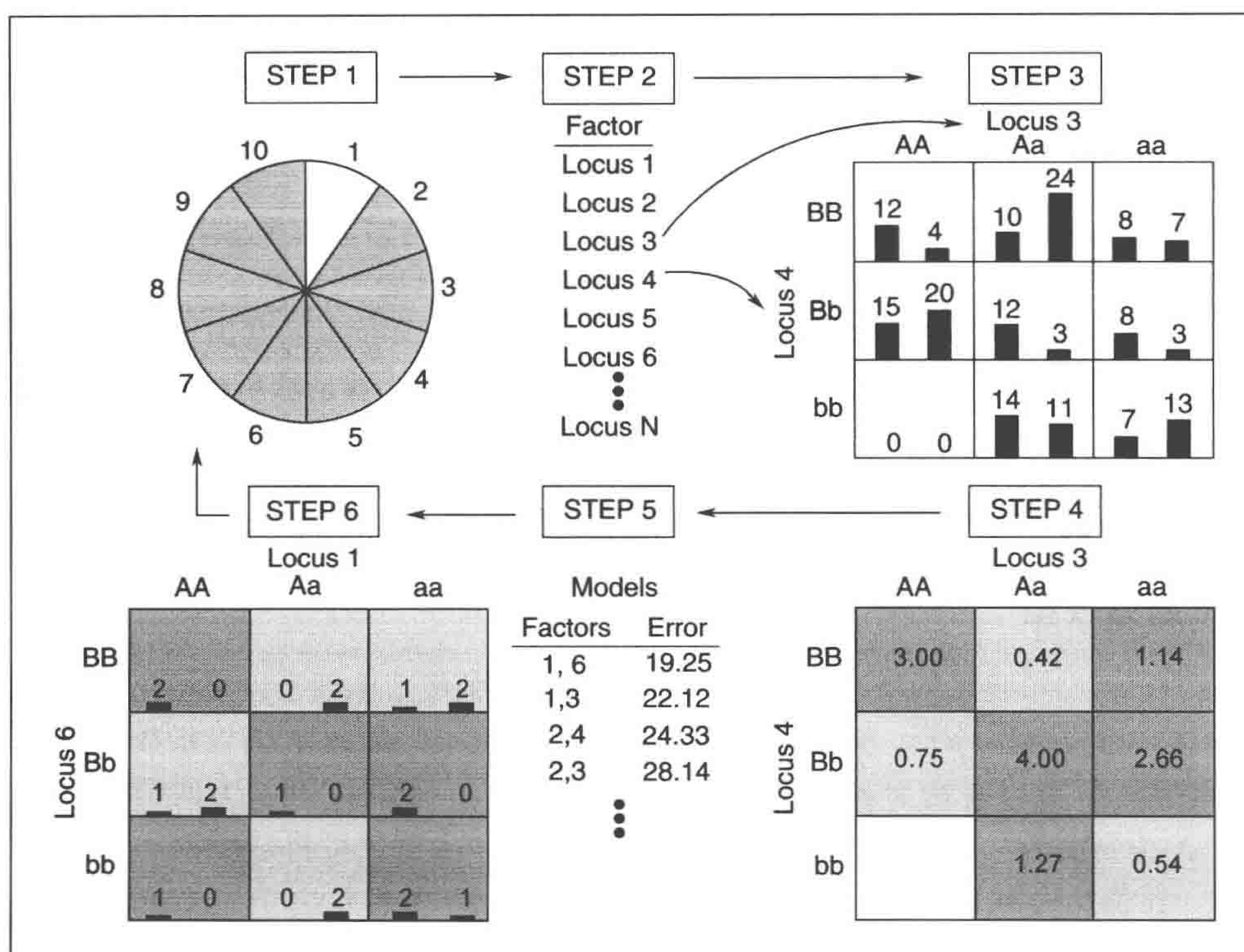


图 1.8.2　应用 MDR 方法的基本步骤的总结。第一步，数据被分为训练集（如数据的 9/10）和一个独立的测试集（如数据的 1/10）以便进行交互验证。第二步，从所有因子中选择 N 个遗传和（或）抽象的环境因子。第三步，N 个因子和其可能的多因子集合包含在 N 维空间中。第四步，如果感染者对未感染者（方格内的数目）的比例超过规定的阈值 T（如 $T=1.0$），N 维空间内的每个多因子被标为高危，如果该比例没有超过规定阈值，则被称为低危。第五步和第六步，应用独立的测试数据选择错分类模式，而且进行预计误差的评估。为交互验证，第一步至第六步要多次重复进行。柱状图代表假想的病例分布（左边）和对照（右边）分布，病例和对照中都具有多因子组合。阴影图代表高危基因型组合，而白色图代表低危基因型组合。灰色图代表没有任何数据的基因型组合。

子集合就被称为“低危”，这样，n维空间就被降到一维。这些多因子集合组成了MDR模式。在所有二因子集合中，选择了一个单独的MDR模式，其具有最少的错误分类的个体。这个两个基因座模式出错概率很小。为评估该模式的预测能力，可以应用10折交互验证法进行预测。为了减少数据的分散带来的误差，整个过程随机抽取不同的数字进行10次，以便使结果更加可靠，准确。

对于有两个以上因子的研究，如果计算允许，都要重复MDR多次，以便适应各种可能的模式。这样的话，结果就是一组考虑了各种可能的模式。基因座和（或）复杂的环境因子的集合可以降低预计误差，因此我们选择了具有这样集合的模式。在独立的测试集中，预计误差可以衡量MDR是如何预测危险状态的。计算10个交互验证实验分集中的预计误差，于是得到预计误差的平均值。通过应用排序实验来评估交互验证的一致性和预计误差，从而对最好的模式进行假设检验。随机对疾病进行编号，MDR分析也要重复多次。针对Unix和Linux操作系统的MDR软件包可以通过http://phg.mc.vanderbilt.edu/Software/MDR/网站免费获得。

对于某一实例，要首先考虑单一的非线性的基因-基因交互作用模型，这一模型以外显率函数的形式表示（表1.8.2）。当一个基因座或者另一个基因座呈现杂合状态时，即可致病。如表1.8.1中模式，每个基因型的疾病易感性是一样的。所以，缺少了一些主效应，会产生明显的交互影响。表1.8.3说明了一个从交互模式中获得的病例对照的资料组。表1.8.4是单基因座实验的列联表。根据Fisher的精确试验评定，基因座A和基因座B都没有显著的单基因座效应。根据遗传模式，基因型像预想的那样，在分布上，与病例对照之间的分布很一样。图1.8.3A对每个二基因座基因型结合描述了病例的分布（左栏）和对照的分布（右栏）。由于病例数目和对照数目平衡，可以直接比较数据。使用MDR，就可以将两个因子转化为一个因子。那些病例多于对照的基因型组合归为一组，而那些对照多于病例的基因型组合则归为另一组（图1.8.3B）。这样，就产生了一个新的变量，该变量具有两个水平，组1和组2（图1.8.3C）。根据这个新变量是否与病例对照有关，再做出评定。按照上面的描述，MDR使用交互验证和排序实验来对每组进行评定。然而，为了描述的方便，以列联表（如在表1.8.5单基因座病例中）的方式考虑这个问题。这里，组1中的每个个体都是受累者，组2中的每个个体则都是未受累者。如果进行χ^2的单自由度结合检验，将得到$\chi^2=20$（$P<0.001$）。这样，新的MDR变量就获得了交互作用的信息。

表1.8.2　缺乏独立的主效应时，两个存在交互作用的SNP不同基因型组合的外显率值

	表外显率			边缘外显率
	AA（0.25）	Aa（0.50）	aa（0.25）	
BB（0.25）	0	1	0	0.5
Bb（0.50）	1	0	1	0.5
bb（0.25）	0	1	0	0.5
边缘外显率	0.5	0.5	0.5	

表 1.8.3　10 个病例和 10 个对照的模拟双基因座基因型

双基因座基因型	
病例	对照
AABb	AbBb
AaBB	AABB
Aabb	AaBb
aaBb	Aabb
aaBb	aaBB
Aabb	AaBb
AaBB	aabb
AABb	AAbb
aaBb	AaBb
AABb	aaBB

表 1.8.4　基因座 A 和基因座 B[a] 的列联表

基因	观察（预期）数		总数
	病例	对照	
AA	3 (3)	3 (3)	6
Aa	4 (4)	4 (4)	8
aa	3 (3)	3 (3)	6
总数	10	10	20
BB	2 (2.5)	3 (2.5)	5
Bb	6 (5)	4 (5)	10
bb	2 (2.5)	3 (2.5)	5
总数	10	10	20

a $P>0.05$，Fisher 的精确检验。

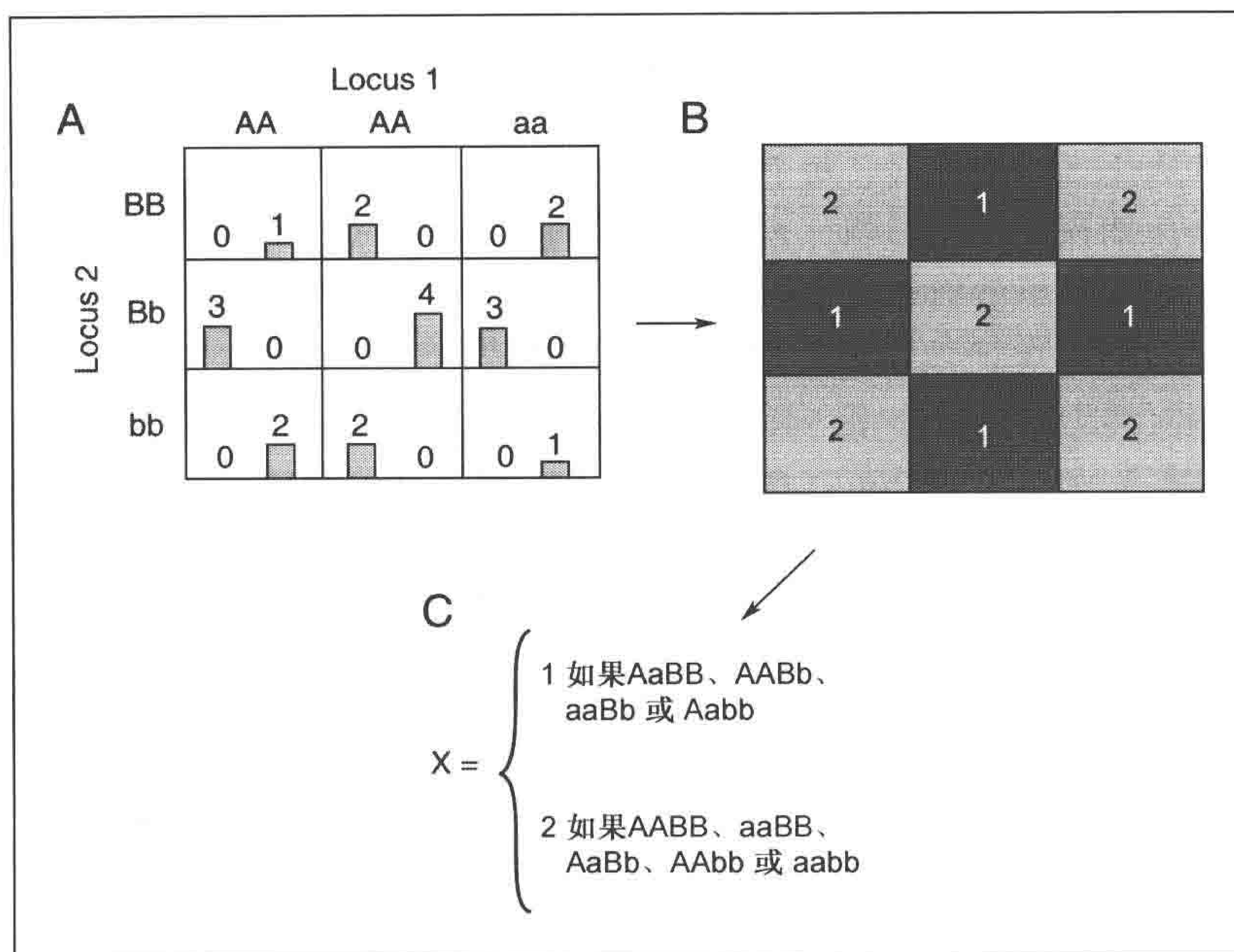


图 1.8.3　是对 MDR 原理的一个简单描述。A 部分显示了如表 1.8.3 中的模拟数据中双位点表型组合的分布（左方块）及控制（右方块）情况。那些受影响比未受影响多的被归类到 1 类并用浅灰色表示，而那些未受影响比受影响多的被归类到 2 类并用深灰色表示（如 B 部分）。C 部分中，新的变量被产生并对应于 1 类和 2 类中的表型。这个新变量又可通过交叉生效测试和排列测试被定值。

表 1.8.5　MDR 变量[a] 的列联表

基因型组合	观察（预期）数		总数
	病例	对照	
组 1	10 (5)	0 (5)	10
组 2	0 (5)	10 (5)	10
总数	10	10	20

a $P<0.001$，χ^2 test (1 df)。

数量性状关联分析中检测基因-基因交互作用的方法

线性回归

线性回归是模拟出一个结果变量（Y）与分散或（及）连续的预变量（如 X_1、X_2）之间的线性关系的一种参数统计学方法。线性模型把 X 与 Y 之间的关系看作 $Y=\beta_0+\beta_1X_1+\beta_2X_2+\varepsilon$。其中 β_0 是表示截距，β_1、β_2 表示回归系数，ε 表示系统误差。在此模型中，Y 对 X_1 的斜率或回归无论 X_2 是多少都是恒定的，这意味着 Y 与 X_1 之间的关系与 X_2 无关。因此，这两个自变量的作用只是单纯的累加。而我们可以通过在上述模型中引进一个结果变量项来计算累加（即两预变量的交互关系）后的偏差。例如，$\beta_3X_1X_2$ 交互作用项的引进使得线性模型中不同的 X_2 值对应不同的 Y 对 X_1 的回归关系。因此，那种无交互作用的检验假设是把 β_3 看作等于0。而做遗传分析时，我们通常习惯把多性状表型用多个虚拟变量进行编码分类。因此一个有 N 个基因型的多态性状就需 $N-1$ 个自变量来编码分类。

相对于逻辑回归，线性回归的优点明显。例如，交互作用可以简化处理，统计学理论用得很突出，并且这种方法可以通过一些商业或免费的统计软件包在标准的电脑桌面上完成。然而，一个最大的缺点就是，当有很多独立的变量时需要很大的样本量来估算模型中的参数。

组合分离方法（CMP）

CMP是由已发展的线性回归转变过来的其中一种。CMP可以同时观测多个多态性位点来鉴定不同的基因型组合在连续性性状中的关系。一些不同位点的基因型可以先归到一小类，因此可以减少在建立交互作用模型中的变量数。首先，所有的多位点基因型被确定然后又被分成好几组，这样划分可以通过两个或两个以上水平用单变量来简化它们的交互作用，也可减少用于编码这些基因型所需的多个虚拟变量。这些新的独立变量可以用上述简单的线性回归方法给予定值。这种数据简化的好处是不管多态表型有多少，我们只需给两个参数定量即可。其次是，所有划分多基因表型的方法都可以被评估，最终确立一种可以覆含绝大多数位点的划分方式。虽然，CMP可以为线性回归提供强有力的转换，但也有一定的局限性。首先，它是通过各种基因型组合分类来筛选，因此计算强度极大。其次，目前还没有可用的软件包。最后，这种方法的有效性和第一类错误出错率并没有完全被评估。

参考文献：Gauderman，2002；Hirschhorn et al.，2002

编　　者：Jason H. Moore

第2章 基因分型

简单序列长度多态（simple sequence length polymorphism，SSLP）是一种信息含量很高的多态标志，在真核基因组中分布很广泛，可用 PCR 的方法进行分型。每个 SSLP 都是基于可变数目的二重、三重、四重核苷酸在特定位置的重复，这些核苷酸重复可以方便地用 PCR 的方法检测出来（即基因分型），通过 PCR 引物与重复片段两侧的单拷贝序列退火结合后扩增。这项技术比较容易实现自动化和高通量的分型，这对于构建真核基因组高分辨率的图谱是很必要的。已经构建了基于 SSLP 的高分辨人类基因组图谱（Genethon：http://www. genethon. fr/php/index _ us. php；Genome Database：http://www. gdb. org）和小鼠基因组图谱（Whitehead/MIT Genome Center：http://www. genome. wi. mit. edu）。

单元 2.1 和单元 2.2 描述用于 SSLP 基因分型的几种基本的方法，这些方法适合分析所有的二重、三重、四重核苷酸重复。单元 2.3 描述了用自动化荧光的技术用于高通量的基因分型。其他高通量基因分型的技术在单元 2.4～2.6 节中进行描述。

第二类在人类和动物遗传图谱中广泛应用的多态是单核苷酸替换和小的缺失。单元 2.2 描述了两种用于分型这类多态的方法：寡核苷酸连接分析法（oligonucleotide ligation assay，OLA ）和连接酶链反应法（ligase chain reaction，LCR），只要核苷酸替换或缺失的侧翼序列是已知的，都可以用这两种方法做基因分型。这些方法都是高效的，只需要用 PCR 的方法扩增 DNA 就可以实现自动化、高通量的分析，而无需在凝胶上检测 DNA 片段。

撰稿人：Nicholas C. Dracopoli

单元 2.1 基于 PCR 的基因分型方法

SSLP 是含有短的简单序列重复的 DNS 片段，如$(CA)_n$，这些重复分散存在于真核基因组 DNA 中。由于这些 SSLP 在长度上的多态，即等位基因间重复次数的多态，SSLP 是非常有用的遗传学标志。用这些方法达到自动化分型每个标志的关键步骤是选择合适的重复单元侧翼序列的 PCR 引物。PRIMER（可免费在 Mark Daly、Whitehead 研究所、Cambridge、Mass 等处获得；mjdaly@genome. wi. mit. edu）、OLIGO（National Biosciences）和 MacVecto（Eastman 实验室研究产品）等程序可以用来设计这样的 PCR 引物。

注意：PCR 相关的实验需要非常小心以防止污染。

基本方案1 用末端标记的引物PCR扩增SSLP

材料（标√的条目参见附录1）

20μmol/L正向和反向引物（−20℃保存）

√10×T4多聚核苷酸激酶缓冲液

10mCi/ml [γ-^{32}P] ATP（3000Ci/mmol）

50U/μl T4多聚核苷酸激酶

√模板DNA：5～20ng/μl保存在TE缓冲液或者水中的基因组DNA

√10×PCR扩增缓冲液，包含15mmol/L $MgCl_2$

√1.25mmol/L 4dNTP混合液

5U/μl *Taq* DNA聚合酶

轻矿物油

√2×甲酰胺载样液（保存在−20℃ 10ml aliquots中小于6个月）

标记的DNA分子质量标记：如γ-^{32}P标记的*Msp* Ⅰ酶消化的pBR322（有12个在100～250bp的范围的片段）和（或）1bp分辨率γ-^{32}P标记M13序列标记

65℃水浴

可适合用在热循环中的96孔微量板

透紫外光的塑料膜（如Saran膜）

可做微孔板的离心机和振荡器（如Beckman或者Sorvall）

适用于96微孔板的热循环仪

用旧的X光胶片或者Whatman 3MM的过滤纸

1. 末端标记足够的可用以扩增100个样本的引物，吸取下列溶液至1.5ml的微量离心管中（附录3E）：

   10μl 20μmol/L的正向或者反向引物；

   2.5μl 10×T4多聚核苷酸激酶缓冲液；

   10μl 10mCi/ml [γ-^{32}P] ATP（3000Ci/mmol）；

   1μl 50U/μl T4多聚核苷酸激酶；

   1.5μl H_2O；

   37℃孕育30min。

   如果一个引物含有重复序列（如Alu），则用另一个引物作标记以得到干净的条带。

2. 65℃加热反应液10min使酶失活，如果需要，可以保存标记好的引物−20℃至一周。
3. 吸取5μl模板DNA至96孔板的每个孔中，以备接下来的热循环用。用盖子或透紫外光的塑料膜盖上板子，放于冰上防止挥发。
4. 根据要扩增的DNA模板量，混合以下的溶液，以准备适量的PCR混合物（每100个模板，多加10%的量以补充在吸取液体过程中的损耗）：

   220μl 10×扩增缓冲液；

   352μl 1.25mmol/L 4dNTP混合液；

44μl 20μmol/L 正向引物；
55μl 20μmol/L 反向引物
27.5μl 标记反应液（来自第 2 步）；
11μl 5U/μl *Taq* DNA 聚合酶；
940.5μl H_2O。

5. 96 孔板的每个孔中加 15μl 的 PCR 混合液，热循环前将 PCR 板放冰上或放冷藏块中，以减少引物错误退火的机会。
6. 用 60μl 的轻矿物油覆盖每个孔以减少挥发，在 Beckman 或 Sorvall 的平板离心机上 4℃，1000～2000r/min 离心 96 孔板。
7. 根据选择的引物和热循环仪的设备设置循环参数；引物的 T_m 值是 60℃的标准的 PCR 反应条件见表 2.1.1。

   通常，退火温度先设成低于最低的 PCR 引物 T_m 值 5℃，然后如果有非特异条带出现则逐步的向上调整退火温度。

表 2.1.1　扩增 SSLP 的热循环参数

过程	温度	Perkin-Elmer 9600 循环仪	Generic 热循环仪
起始变性	94℃	3min	3min
30 个循环	94℃	15s	30s
	55℃	30s	2min
	72℃	30s	2min
最终延伸	72℃	5min	7min
保持	4℃	—	—

8. 不加孔板开始热循环，当温度达 94℃时，放孔板到热循环仪上完成热循环。当循环完成时，每个孔加 20μl 的 2×甲酰胺载样液。如果需要，可在加载样缓冲液之前或之后，将孔板放置于耐热有机玻璃盒子里保存在－20℃不超过 2 周（最好立即用）。
9. 准备 6％的变性聚丙烯酰胺胶（附录 3F）。40W 预电泳 1h（恒定功率）。在跑胶的过程中可以调节功率使胶的温度保持在约 55℃。
10. 上样前，94℃ 5min 变性样品后很快放冰上冷却。通过吹打缓冲液将胶孔里的尿素清除。每个胶孔加 2μl 的样本，每个胶孔的样本里都包含有一个标记了的 DNA 分子质量标记（如 γ-^{32}P 标记的 *Msp* Ⅰ 酶消化的 pBR322）。为了比较在不同的胶上跑着的大批 PCR 产物，每个胶都要跑一个或者两个参考 DNA 的 PCR 产物或者一个 1bp 分辨率的 γ-^{32}P 标记的 M13 序列内标。
11. 在恒定的功率下跑胶 2～3h，保持胶的温度在 55℃，直到二甲苯青跑到胶底。
12. 将胶板的夹子取掉，放平，硅烷化面向上。用一个长的金属压刀慢慢分开胶板（胶应该黏附于底板上），将一个用旧的 X 光胶片或者 Whatman 3MM 的过滤纸放在胶上，将于胶之间的气泡赶出。将胶板提起来慢慢的将胶从玻璃板上剥落，用透紫外光的塑料膜将胶包裹起来。用一个增光屏在 2～24h －70℃放射自显影照相。

备选方案 用内部标记的方法 PCR 扩增 SSLP

当 DNA 模板有限检测的引物很多时，这个流程可减少人工操作而且相对于末端标记的方法（基本方案 1）是用放射性的方法。

附加材料（亦见基本方案 1；标√的条目参见附录 1）

DNA 模板：5～20ng/μl 保存在 10mmol/L Tris-Cl/0.2mmol/L EDTA，pH 7.3 的基因组 DNA（保存于 4℃）

√10×冷的核酸混合物

引物混合物：每个正向和反向的引物都是 100ng/μl（保存于－80℃）

10μCi/μl [α-^{32}P] dCTP（800Ci/mmol）

1. 96 孔板每个孔中加 1.5μl DNA 模板，用盖子或塑料膜（如 Saran 膜）盖上孔板，保存于冰上。
2. 根据要扩增的 DNA 模板量，混合以下的溶液，以准备适量的 PCR 混合物（每 100 个模板，多加 10%的量以补充在吸取液体过程中的损耗）：

   110μl 10×PCR 扩增缓冲液；
   110μl 10×冷的核酸混合物；
   11μl 引物混合物；
   7.7μl [α-^{32}P] dCTP；
   6.6μl 5U/μl *Taq* DNA 聚合酶；
   689.7μl H_2O。

   [α-^{35}S] dATP 也可用，但是由于生成的信号较弱，在放射自显影照相前需格外的干燥胶。
3. 每个孔中加 8.5μl 的 PCR 混合物，分别加 30μl 的轻矿物油覆盖。执行热循环、电泳和放射自显影照相的步骤（基本方案 1，第 6～12 步）。

基本方案 2 用银染的方法无放射性的分析 SSLP

在所有的配方和步骤中都需用无菌的去离子双蒸水。在下面的步骤中每种溶液大约用 200ml。

材料（标√的条目参见附录 1）

PCR 扩增 SSLP 的变性聚丙烯酰胺凝胶（基本方案 1，第 3～11 步）

10%（V/V）乙醇

1%（V/V）硝酸

√硝酸银染色溶液

√显色液

10%（V/V）乙酸

染色的仪器：如图 2.1.1 所示

Whatman 滤纸

80℃真空电炉

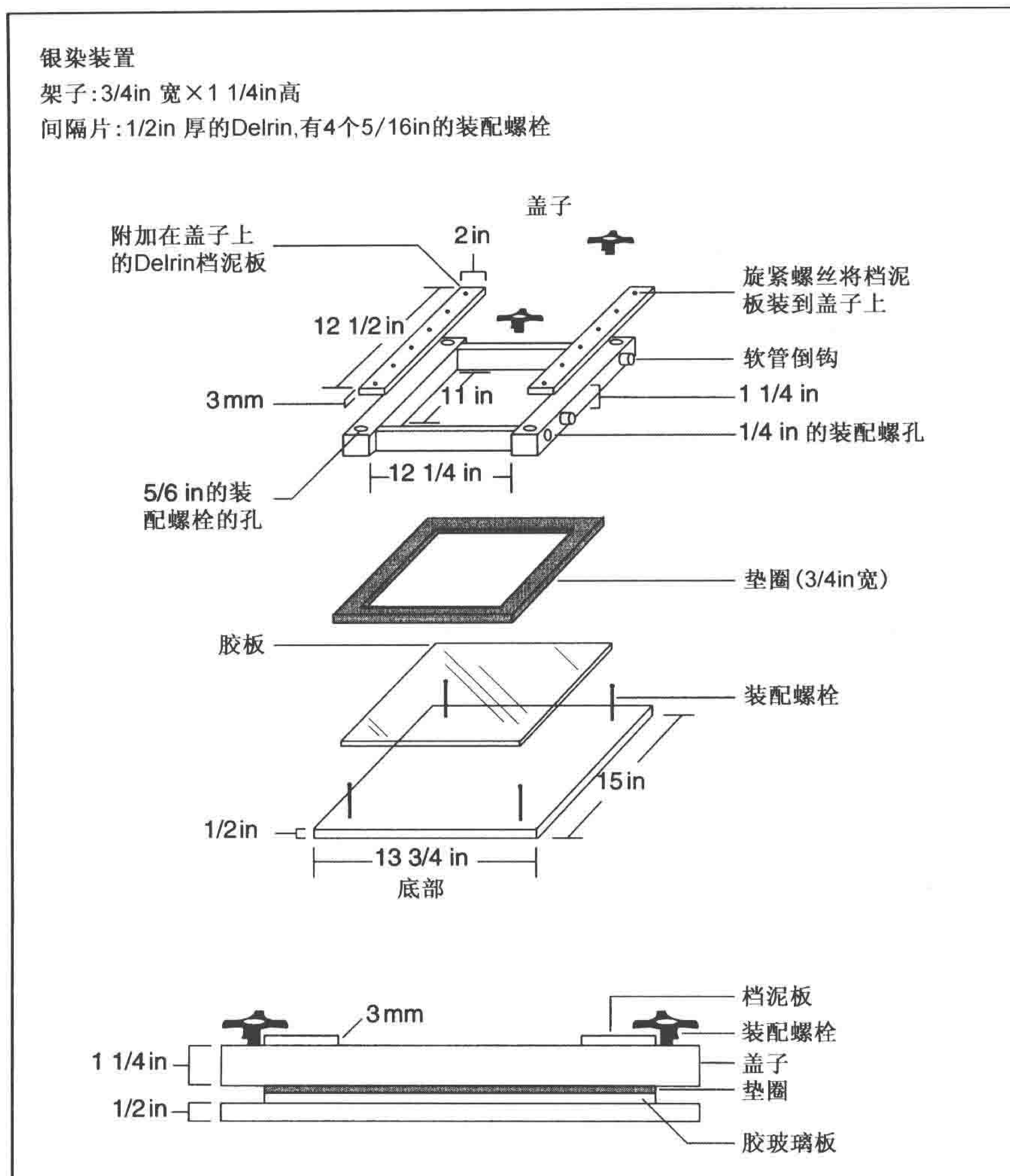


图 2.1.1　染胶装置（Bender 等 1994 年设计），档泥板用胶和螺丝附加在盖子的架子上以防止漏胶。

1. 电泳后，小心的打开仪器，分开玻璃板。将有胶的那块板子放于染色一起的底部，仔细地将上面的架子和垫圈放置于胶边缘的上面，拧紧闩子。

   胶里如果有小空隙的话将会使溶液从胶和玻璃板间流出，可以通过加（逐滴注入）一点含有高浓度过硫酸铵的 Sequagel-6（National Diagnostics）将缝隙填满，胶将会快速地聚合。

2. 在 10％的乙醇里洗胶 5min，然后倒掉乙醇，在 1％的硝酸溶液里氧化胶 3min，倒掉硝酸溶液。用水漂洗胶 5s，然后倒掉水。
3. 加硝酸银染液，盖好一起以防透光，染 20min 后，倒掉硝酸银溶液并按安全的规章制度处理这些溶液，用水漂洗胶 5min 后倒掉。
4. 加显色液还原胶（溶液最初的颜色是黄褐色），轻轻地晃动染色仪使溶液没过胶，倒

掉再加入新鲜的显色液，直到溶液不再改变颜色，溶液变清（溶液变清大约 2min 后，条带将开始显现）。

5. 在条带开始显现而胶边棕色前将展开液倒掉（避免展开过度），在 10%乙酸中浸泡 1min 终止展开，倒掉乙酸溶液，用水漂洗 5s。
6. 将 Whatman 的滤纸直接放到胶上，轻轻地把胶从玻璃板上转移到滤纸上，80℃真空干胶 1h，记录结果。切掉多余的胶保存有结果信息的部分（真空抽干的胶可以保存 2 年而没明显的信息丢失）。

基本方案 3　无放射性的多重分析 SSLP

图 2.1.2 是对这个操作流程图的总结，这种方法提供了最好的数据结果因为胶的每个胶道都包含有一个内标。

材料（标√的条目参见附录 1）

模板 DNA：每个要分型个体的基因组 DNA，10ng/μl，水溶的（不是 TE 缓冲液溶解）

混合引物：对于每 24 个要扩增的 SSLP，混合同样 6.6μmol/L 的正向引物和 6.6μmol/L 的反向引物（最终每种 3.3μmol/L）；可无限期的保存在－20℃

√10×PCR 扩增缓冲液，包含 15mmol/L $MgCl_2$

√2.5mmol/L 4dNTP 混合液

5U/μl *Taq* DNA 聚合酶

轻矿物油（可选）

Qiaex Gel Extraction Kit（Qiagen）包括 QX1 溶液、QX2 溶液和 Qiaex 玻璃悬浮珠

√2×甲酰胺载样缓冲液

M13 序列泳道内标（支持方案 1）

√TBE 缓冲液

√预杂交液

地高辛标记的探针（由扩增 SSLP 的引物和 M13 抗通用引物组成；见支持方案 2）

√Oligo 清洗缓冲液

√阻滞液

碱性磷酸盐连接的抗地高辛 Fab 片段（Boehringer Mannheim）

√检测缓冲液

√底物缓冲液

√0.2mmol/L CSPD

√2mmol/L EDTA/0.2%（*m*/*V*）SDS，预热到 70℃（由灭菌的阻滞液组成，见配方；室温保存）

96 孔板

0.2ml 薄壁 PCR 管按照 96 孔（8×12）方式排列

MicroAmp Full Plate 盖子（Perkin-Elmer；使用前用肥皂和水清洗干净，在 10%

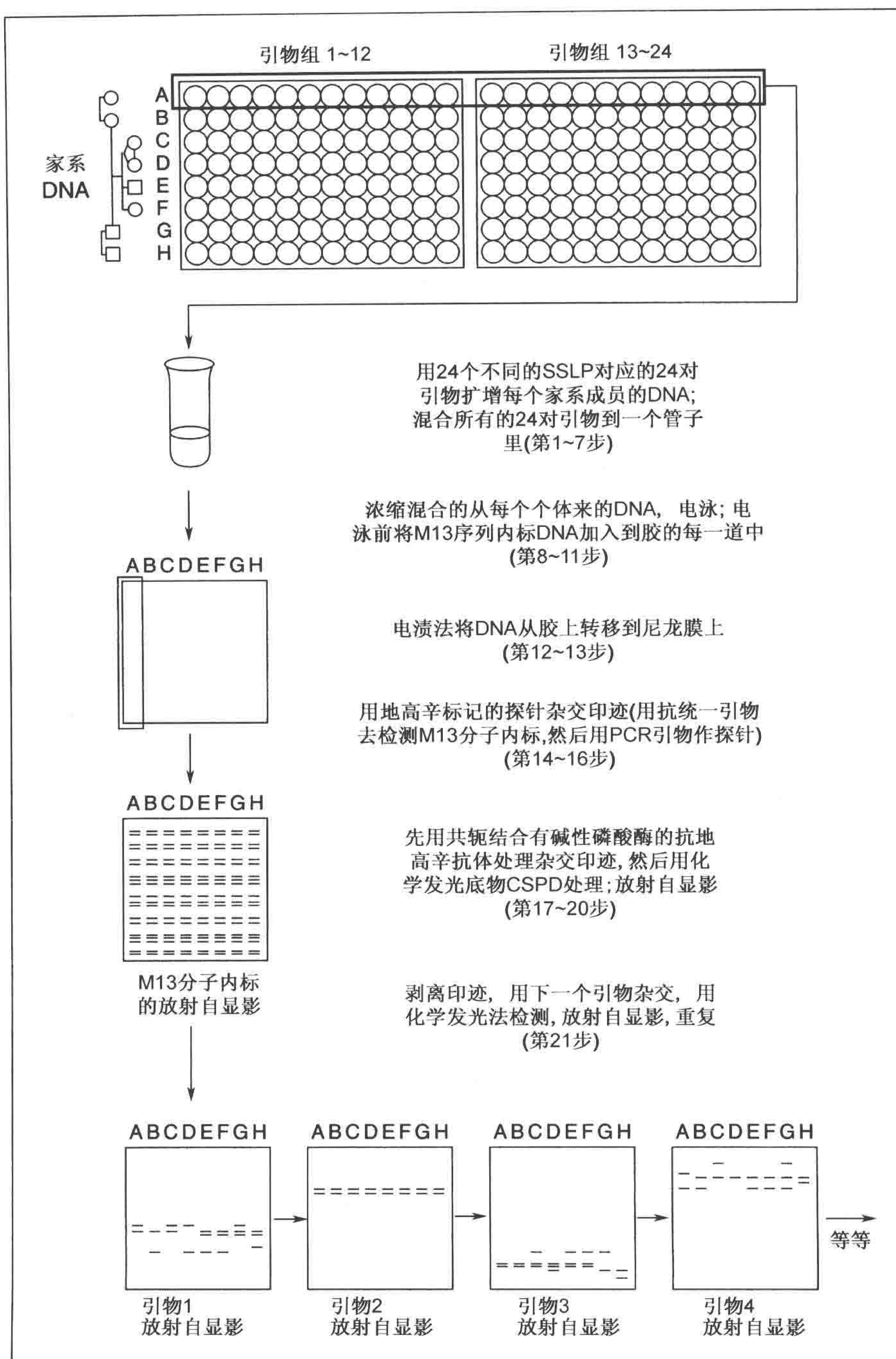


图 2.1.2　无放射性多重分析 SSLP 的流程图。

的漂白液中浸泡过夜，然后高压灭菌）

可预热盖子的热循环仪，适合于用 0.2ml 按 96 孔方式排列的薄壁 PCR 管，预热至 94℃

42℃水浴

Blotting 滤纸（最好是 Owl Scientific Plastics）
TE 90 GeneSweep 测序胶转移装置（Hoefer）
Hybond-N 膜（重要的选择；Amersham）
80℃烤箱
Stratalinker（Stratagene）
38mm×300mm 玻璃管，硅烷化的（如 CPMB 附录 3）
杂交烤箱（如 Robbins Scientific 的杂交培养箱 400）
摇床（如 Robbins Scientific 的培养箱 V5250 型或者 400 型设置为室温）
透明的塑料胶片（最好是 Saran 包裹的）或两个薄的聚丙烯片胶片盒
自动放射自显影胶片（如 Hyperfilm-MP、Amersham）
70℃培养箱

1. 24 重分析的设置（8 个 DNA 模板加 24 对引物），将 0.2ml 的细长的 PCR 管按图 2.1.2 所示排列成 96 孔格式，放冰上。分别吸第一个家系成员的模板 DNA 5μl 到 A 行的 24 个管子中，吸第二个家系成员的 DNA 入 B 行，直到所有 8 行都加满。
2. 加前第 12 对引物混合物各 15μl 到放置于冰上的 96 孔板中。

   混合模板和引物以 12 个为一组因为大多热循环仪一次只能操作一块板子，而第 3 步的主要的混合物需要在循环扩增前准备。
3. 在置于冰上的 1.5ml 的离心管中混合下面的溶液（最终是 490μl）：
   140μl 10×PCR 扩增缓冲液；
   112μl 2.5mmol/L 4dNTP 混合液；
   231μl H_2O；
   7μl 5U/μl *Taq* DNA 聚合酶。
4. 每个孔加 35μl 的第 3 步的混合液到第 2 步的孔板中，从开始的引物混合液中吸取 5μl 到 96 孔中第 1 列的 8 个管子中，重复加引物从第 2 列到第 12 列，直到 12 对引物的每对引物都和 8 个 DNA 模板的每一个混合。
5. 用 MicroAmp Full Plate 盖子盖上管子，迅速放到热循环仪上预热至 94℃。如果热循环仪没有加热盖子，则每个孔加 30μl 轻矿物油。按下面的流程执行 PCR 反应（基本方案 1）。

第一步：	5 min	94℃（变性）
30 个循环：	10s	94℃（变性）
	30s	55℃（退火）
	30s	72℃（延伸）
最后延伸：	5min	72℃（延伸）
最后一步：	无限时间	4℃（保持）

   这些参数对于 T_m 值为 60℃的引物是理想的，虽然对 T_m 值为 55～70℃的引物都曾成功地扩增。如果 PCR 失败，根据引物的 T_m 值优化退火温度。
6. 重复第 2～5 步，扩增加有剩下的 12 对引物混合液的 13～24 列的 DNA。
7. 从水平行的 24 个管子中每个取 10μl 混合到一个管子中，这 24 个管子都是来自于同一人的 DNAPCR 反应产物（共 240μl）。

8. 加 3 倍体积的 QX1 溶液（720μl）和 10μl 玻璃珠悬浮液，旋涡振荡，室温孕育 5min，最大速度离心约 30s，吸取并倒掉上清。加 0.5ml QX3 溶液，旋涡振荡，最大速度离心约 30s，吸取并倒掉上清。再用最大速度离心吸掉所有残留的上清。加 20μl 水重悬珠子，42℃孕育 5min 使 DNA 从玻璃珠中洗提出来。如果必需，保存洗提的 DNA 于－20℃。
9. 准备 5%变性聚丙烯酰胺凝胶（附录 3F），用 0.4mm spacer。70W 恒压预电泳 20～30min。
10. 最大速度离心混合的 DNA 样本 1min（混合有玻璃珠的），然后混合一下溶液：
    0.5～2.0μl 混合的 DNA 样本；
    1 倍体积的 2×甲酰胺载样缓冲液；
    0.2μl M13 标准大小的内标。
11. 上样前，短暂的 94℃热变性 DNA 样本 2～3min，然后快速地置于冰上。用 TBE 冲洗胶孔以去除尿素，每道上 1～3μl 样本，于 70W 在 TBE 缓冲液中跑胶 1.5～2h。为了能识别参考等位基因片段是 100bp 的 SSLP，跑胶到二甲苯青 FF 距胶底大于等于 15cm 时停止。对于大于 200bp 的 SSLP，跑胶到二甲苯青 FF 距胶底大于等于 5.5cm 时停止。
12. 将胶板从电泳的仪器上卸下，平放胶板，将上面的胶板移去。用 TBE 缓冲液浸湿一张 blot 滤纸，将多余的缓冲液滴干，滤纸的光滑面朝胶放下，避免有气泡。通过提起滤纸缓慢的将胶从玻璃板上剥离下来。如果胶没有黏附到湿滤纸上，则用一张干纸将 blot 纸上多余的缓冲液洗掉。将滤纸和胶放置于 TE 90 GeneSweep 测序胶转移装置上，胶面向上。戴手套，用 TBE 缓冲液浸湿一张 Hybond-N 膜，小心地将膜放在胶表面，避免有气泡。用 TBE 缓冲液浸湿另一张 blot 滤纸，放置于膜的上面，这样就成了滤纸、胶、膜、滤纸的夹层结构。
13. 根据 GeneSweep 仪器 electroblotting 的操作手册指示，转移完全后（大约 5min），将最上层的滤纸去掉，将膜从胶上剥离，用戴手套的手将膜上残留的胶完全去掉。80℃烘烤膜 20min，用紫外交联，DNA 面朝上，120mJ/cm^2，Stratalinker 设为自动交联。

    也可以用 Capillary action 的 Southern 印迹方法转膜（附录 3G）。
14. 将膜卷起成管状，放入一个 38mm×300mm 的玻璃管中，加 25ml 预杂交液（可杂交 800cm^2 的点，根据特异的点大小调整），在杂交炉里 37℃孵育 15min，然后将杂交液倒掉。
15. 加 10pmol 地高辛标记的探针到 10ml 的预杂交液中，混合（终浓度应该是约 1pmol/100cm^2 膜）。加溶液到有斑的管子中，在杂交炉中 37℃孵育大于 1h。

    用由 M13 的抗统一引物做成的探针用于第一次杂交以全面评估胶和转移的质量。

    对于过夜的杂交，大量的探针可以减少 2 倍，如果两个 SSLP 标记可以区分大于 50bp（即它们的带不会重叠），那么这两个 SSLP 可以通过混合探针被同时检测（每个 1pmol/100cm^2 膜）。
16. 室温用 100ml 的 oligo 水缓冲液洗 6 次，倒掉水前用力的摇管子几次。立即加 50ml

新鲜的预阻滞液，室温在摇床上摇 30min，弃去溶液。

17. 用 50ml 检测缓冲液混合 5μl 的碱性磷酸盐连接的抗地高辛 Fab 片段（1∶10 000稀释）。加入到杂交斑的管子中室温在摇床上摇 30min，弃去抗体溶液。
18. 快速地用 50ml 的检测液漂洗杂交斑。室温下用 80ml 的检测液洗 3 次每次都在摇床上摇 5min。
19. 快速地用 25ml 的底物缓冲液漂洗杂交斑，弃去缓冲液。加 10ml 0.2mmol/L 的 CSPD 37℃摇 10min。
20. 从管子里拿出杂交斑，让其潮湿但不滴水，用透明的塑料胶片包裹或将其置于两层薄的聚丙烯薄片中。用玻璃吸管将气泡吸去。加了 CSPD 6～8h 内放平包裹的膜，DNA 面朝上，在胶片盒中，37℃暴露放射自显影 30min。
21. 为了剥掉斑点，转移到 38mm×300mm 的硅玻璃管中，加 100ml 的 2mmol/L EDTA/0.2% SDS（预热至 70℃），70℃在摇床上孵育 10min，弃掉溶液再重复。保存于一定湿度，室温下，封闭 38mm×300mm 的管子，用 Sanran 包裹，直到下次被标志探针。用其他的地高辛标记的探重复第 14～21 步。

支持方案 1　制备 M13 序列内标

M13 序列 ladder 的 A 道在基本方案 2 中作为跑胶中每个胶孔的内标使用，以区分 SSLP-PCR 的产物。

M13 DNA、DTT、测序反应缓冲液、T7 DNA 聚合酶和终止缓冲液都包括在 DNA 测序手册 2.0 版本中（U. S. Biochemical）。

材料（标√的条目参见附录 1）

在 TE 缓冲液中的 M13mp18 单链 DNA（U. S. Biochemical）
0.5pmol/μl M13 统一测序引物（5′-GTAAAACGACGGCCAGT-3′；如 U. S. Biochemical）
√5×测序反应缓冲液（U. S. Biochemical）
√TE 缓冲液
√0.1mol/L DDT
√7.5μmol/L 4dNTP 混合液
13U/μl 测序 T7 DNA 聚合酶 2.0 版（U. S. Biochemical）
终止反应混合液：dGTP、dATP、dCTP、dTTP 每种 80μmol/L，加 8μmol/L ddATP 在 50mmol/L 的 NaCl 中（U. S. Biochemical 有准备好的混合物）
√2×甲酰胺载样缓冲液

1. 在微量离心管中混合下面的成分：
   38μg M 13mp18DNA；
   24μl 0.5pmol/μl M13 统一测序引物；
   40μl 5×测序反应缓冲液；
   加 TE 缓冲液至 200μl。
   65℃加热 2min 退火，然后缓慢冷却至小于 35℃。最大速度短暂离心。

2. 加以下成分到冷却的退火混合液中：
   20μl 0.1mol/L DTT；
   8μl 7.5μmol/L 4dNTP 混合液；
   32μl H_2O；
   45μl TE 缓冲液；
   5μl 测序 T7 DNA 聚合酶。
   室温下放置 7min。
3. 预热一个 1.5cm 的微量离心管，管中有 200μl 的终止混合液，加入第 2 步的混合液，37℃孵育 5min。加入 320μl 的 2×甲酰胺载样缓冲液终止反应。可无限期地保存于 −20℃。

支持方案 2　用末端转移酶的地高辛标志的探针

在基本操作流程 2 中用于扩增每个 SSLP 的 M13 抗统一引物和正向或反向引物都是用地高辛-11-dUTP 标记尾部的。为了只检测 PCR 产物的一条链，对于一个 SSLP 只用一个引物作为杂交的探针是很重要的；如果 CA 链和 GT 链都需要同时检测，它们的不同迁移模式将会使分型变得复杂。

材料（标√的条目参见附录 1）

√5×终止转移酶反应缓冲液，pH 6.6
25mmol/L $CoCl_2$
6.6μmol/L 正向或反向引物用于扩增每个 SSLP（基本方案 2）
6.6μmol/L M13 抗统一引物（5′-ACTGGCCGTCGTTTTAC-3′）
1mmol/L 地高辛-11-dUTP（Boehringer Mannheim）
10mmol/L dATP
50U/μl 终止转移酶（Boehringer Mannheim）
√0.2mol/L EDTA，pH8.0

1. 为每一个引物（包括 M13 抗统一引物）准备反应混合液：
   6μl 5×终止转移酶反应缓冲液；
   6μl 25mmol/L $CoCl_2$；
   15μl 6.6μmol/L 引物；
   1μl 1mmol/L 地高辛-11-dUTP；
   1μl 10mmol/L dATP；
   1μl 50U/μl 终止转移酶。
2. 37℃孵育 20min，然后加入 2μl 0.2mol/L EDTA 终止反应，标志好的引物可以无限期地保存于−20℃。

   在这个方法里，标志时末端的长度平均是 50bp（10～100bp），5 个地高辛-11-dUTP 的核苷酸位于末端，可以用点印迹的方法检测标志反应。

参考文献：Dib *et al.*，1996；Weber and May，1989；Weissenbach *et al.*，1992

编者：Thomas J. Hudson，Chris D. Clark，Michele Gschwend，and Erica Justice-Higgins

单元 2.2 基于连接分析的分型方法

是否可以用连接分析法取决于两个相邻的 15～20 个碱基的寡核苷酸引物是否可以

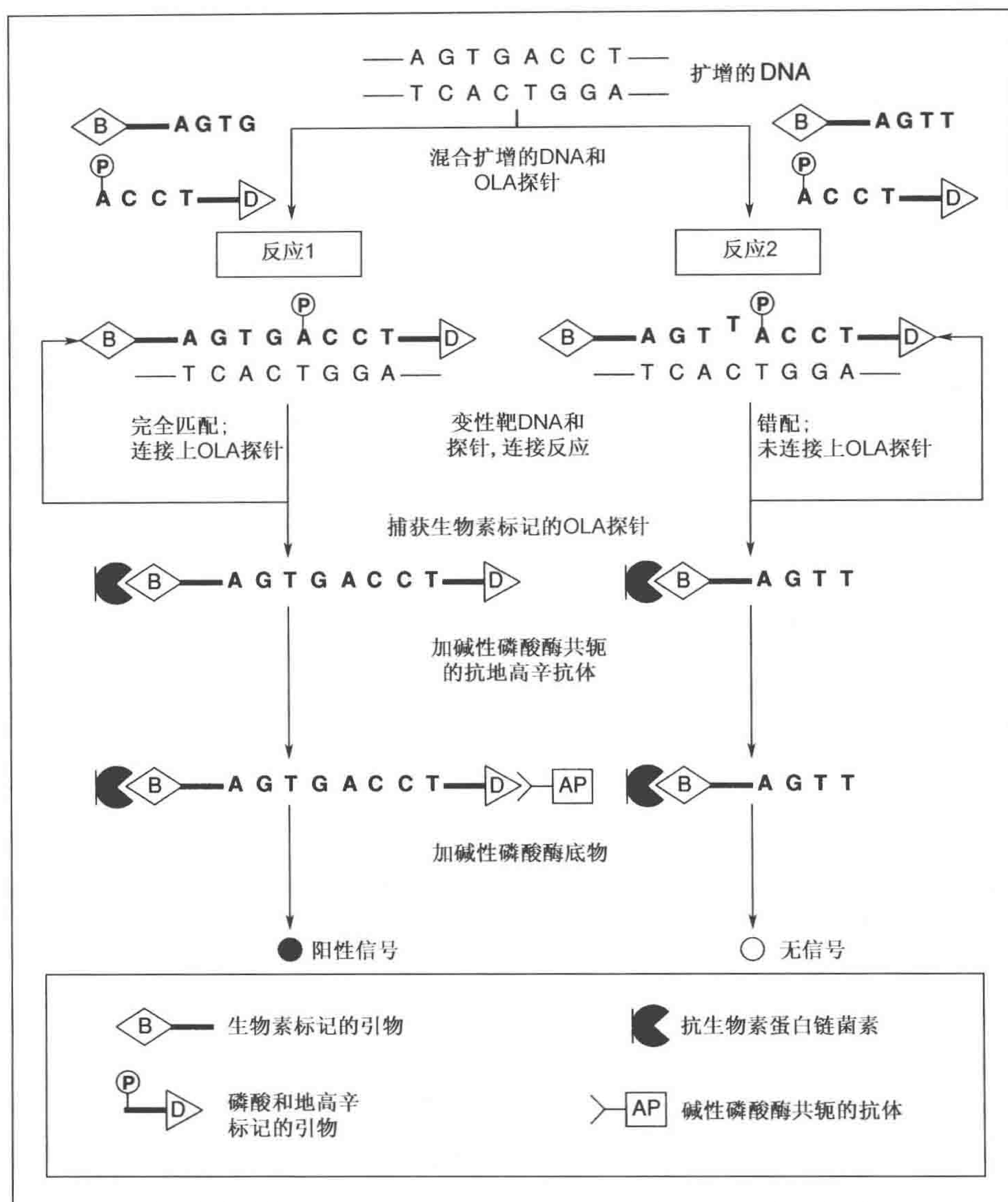


图 2.2.1 图示寡核苷酸连接分析法（OLA）。要分型一个核苷酸的替换（如这里显示的 G 到 T 的替换），需要平分 DNA 扩增产物，两个 OLA 反应，一个检测等位基因 G（反应 1），另一个检测等位基因 T（反应 2）。在互补靶 DNA 的存在下，DNA 连接酶共价的结合生物素标记的探针到地高辛标记的探针上（图左），如果有一个探针/靶 DNA 错配，探针就不会结合（图右）。为了测定连接反应的结果，生物素标记的探针被捕获到一个清洗过的支持物上，做了地高辛的酶联免疫反应。一个颜色信号的存在或缺失显示探针是否被连接到扩增靶 DNA 上。在这个例子中，靶 DNA 是纯合的 G 替换，信号就只能从那个反应中得到。纯合靶 DNA 只在两个 OLA 反应中有一个阳性信号（反应 1 或者反应 2），杂合的靶 DNA 在反应 1 和反应 2 中都会有阳性信号。

在它们杂交到一个目标模板（如一个 PCR 产物或基因组 DNA 模板）上时被连接起来。用 DNA 连接酶连接引物需要在杂交的寡核苷酸连接处有互补的碱基对。甚至一个碱基的错配都会阻止两个相邻引物的连接（图 2.2.1）。因此，用连接分析方法可以成功地检测单个碱基的改变。连接的分析方法对于分型目标模板中已知的插入和缺失也是有用的，因为两个引物也必须能够连接起来。

注意：涉及 PCR 的实验需要非常小心地防止污染。

基本方案 1　寡核苷酸连接分析法

寡核苷酸连接分析法（oligonucleotide ligation assay，OLA）用三个寡核苷酸引物去分型单核苷酸多态——两个 5′生物素标记的引物（每个等位基因片段一个）和一个相邻的 3′地高辛标记的引物（图 2.2.1）。

材料（标√的条目参见附录 1）

√抗生物素蛋白链菌素包被的微量滴定板
√阻滞缓冲液：在 PBS 中的 0.5%（*m/V*）BSA（PBS 的配方）
修饰的寡核苷酸引物（支持方案）：5μmol/L 两个等位基因特异性的引物，5′端标记有生物素和一个普通的报道引物，3′端标记有地高辛，5′端磷酸化
√OLA 连接混合物
扩增的目的 DNA（单元 7.1），80～1500bp
0.1%（*V/V*）氚 X-100
矿物油
5U/μl 热稳定的 DNA 连接酶（如 Epicentre Technologies）
100mmol/L EDTA/0.1%（*V/V*）氚 X-100
√Tris/NaCl 清洗缓冲液
0.01mol/L NaOH/0.05%（*V/V*）Tween 20
碱性磷酸酯酶标记的抗地高辛抗体（Boehringer Mannheim）
√比色底物
柔软的圆底 96 孔微量板（Falcon）
可使用 96 孔板的热循环仪或可使用 96 孔板的加热板
微量板的分光光度计

1. 通过在水槽轻弹和在一张纸巾上轻轻拍干板子以去除抗生物素蛋白链菌素包被的微量滴定板上的抗生物素蛋白链菌素。每个孔里加 200μl 阻滞缓冲液，第 5 步用之前室温下孕育大于 20min。
2. 为分型的每个等位片段准备一份单独的连接混合液：加 2μl 适量的生物素标记的寡核苷酸和 2μl 地高辛标记的报道寡核苷酸到 600μl 的 OLA 连接混合液中，连接混合液中已包含有 2μl 5U/μl 热稳定的 DNA 连接酶（正好够在微量板中分型 48 个 DNA 模板用）。
3. 在柔软的圆底 96 孔微量板的奇数列的每个孔中加 10μl 等位片段 1 的连接混合物。在偶数列的每个孔中加等位片段 2 的混合物。

4. 用 90μl 0.1%（V/V）Triton X-100 稀释 10μl 的扩增目标 DNA，每个孔加 10μl，用 60μl 的矿物油覆盖反应液（如果热循环仪有加热的盖子的话则不需要）。按照下面的程序在 96 孔热循环仪上执行连接反应。

   10 个循环：　30s　　93℃（变性）
   　　　　　　2min　　58℃（退火/连接）

   每个反应中加 10μl 的 100mmol/L EDTA/0.1%（V/V）Triton X-100 以终止连接。
5. 通过在水槽中轻弹和轻轻拍干板子以去除抗生物素蛋白链菌素包被的微量滴定板上的封闭液，用 Tris/NaCl 清洗缓冲液洗板子一次，拍干。
6. 将连接反应液转移到抗生物素蛋白链菌素包被的微量滴定板里，室温下孵育 30min 以上以捕获生物素标记的寡核苷酸，用 0.01mol/L NaOH/0.05%（V/V）Tween 20 清洗板子 2 次（以去除没有连接上的报道引物），用 Tris/NaCl 清洗缓冲液清洗板子 2 次。
7. 用封闭液配制 1∶1000 稀释的碱性磷酸酯酶标记的抗地高辛抗体。每个孔加 30μl，室温下孵育 30min。用 Tris/NaCl 清洗缓冲液清洗板子 5 次，每个孔加 25～50μl 的比色底物，室温下孵育 10～15min，在微量板的分光光度计上读取数据。

基本方案 2　连接酶链反应法（ligase chain reaction，LCR）

通过在目的 DNA 的每个互补链上执行连接反应，就可能以指数方式扩增连接分析的产物（图 2.2.2）。LCR 可以通过连接反应增加 DNA 分型的敏感度。当用放射性同位素标记时，特异性的 DNA 只需要 200 个分子就可以被检测出来。

材料（标√的条目参见附录 1）

√LCR 混合液
√LCR 的寡核苷酸引物：等位基因特异性的引物和 ^{32}P 标记的与两条目的链都互补的联合引物（图 2.2.2）
5U/μl 的热稳定的连接酶（如 Epicentre Technologies）
目标DNA：10μl 的 PCR 产物（单元 7.1）或大约 10ng 的基因组 DNA 样本（附录 3A）
矿物油
甲酰胺
DNA 分子质量标记
自动热循环仪或者 96 孔板的加热块

1. 为每个等位基因分别配制连接反应体系（每个都包括两个等位基因特异的引物和两个标记的联合引物）：
   100μl LCR 混合液；
   每条链 40fmol 的等位基因特异的引物；
   每条链 40fmol ^{32}P 标记联合引物；
   0.5U 的热稳定的连接酶。
2. 每个等位基因特异性的连接混合物里混合 10μl（10～50ng）的目标 DNA，用 30μl

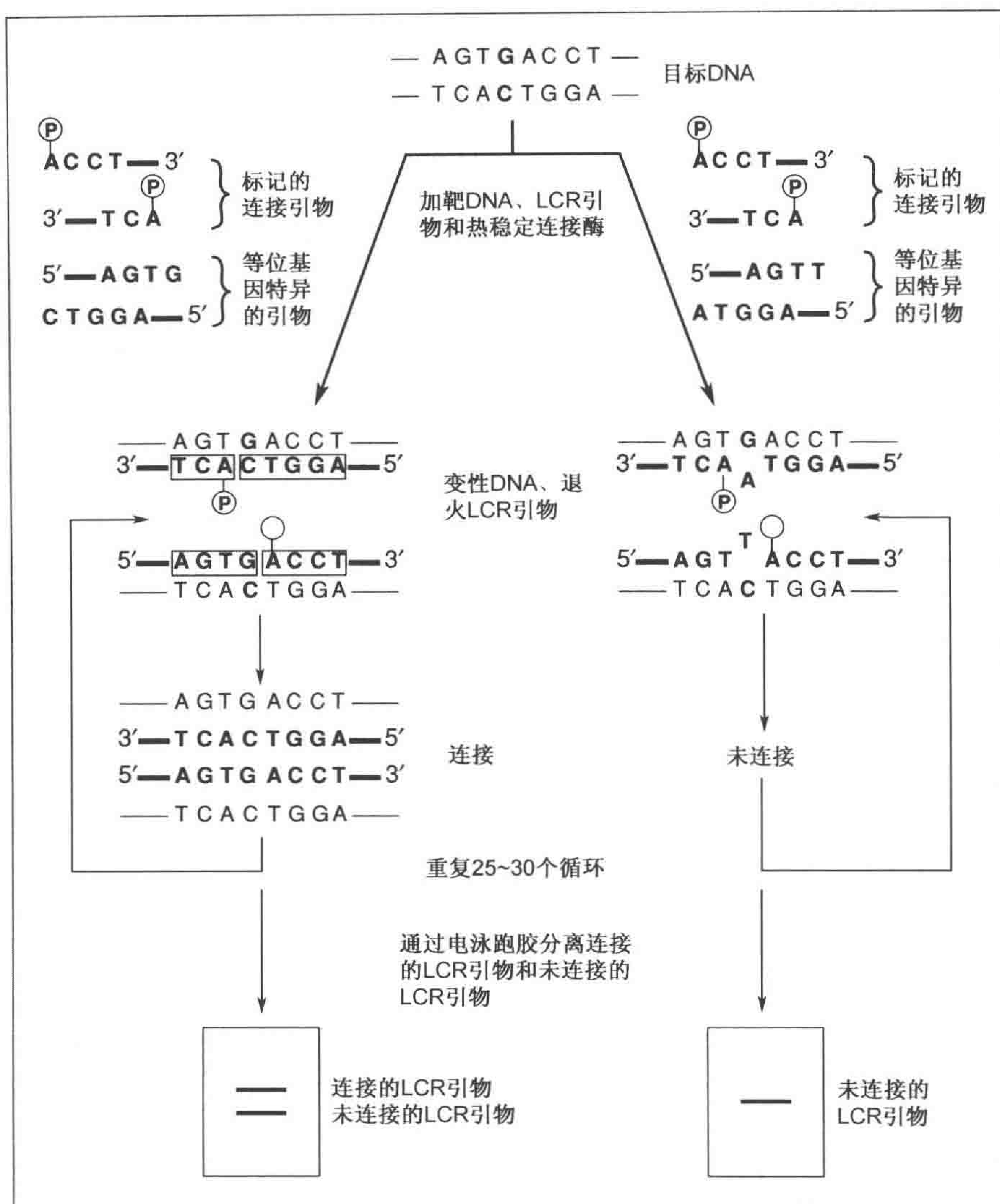


图 2.2.2　图示连接酶链反应（LCR）的操作流程。这个过程的磷酸组都是放射性标记的。加到反应中的 4 个引物应该设计成连接反应时会产生 3′端空悬一个碱基的引物（如用加框的引物所示）。这个设置可以最大限度地减少非特异性的连接反应发生，等位基因特异的引物的 5′端可以加 2bp 的空悬以减少目标依赖性的引物连接。

的矿物油覆盖反应液。

3. 在自动热循环仪或者 96 孔板的加热块执行 LCR 反应，用下面的扩增循环程序。

25～30 个循环：	30s	94℃（变性）
	2min	65℃（退火/连接）

30 个循环后，背景连接事件开始以指数级扩增，为了降低在连接点的非特异扩增，应该用 3′端有单个碱基重叠的引物。

4. 每个反应用 4μl 的甲酰胺混合 4μl 的反应液，100℃加热 2min 变性后，在 10%变性聚丙烯酰胺胶上样（附录 3F），点合适的标记分子 marker，60W 电泳 2h。

5. 烤干胶，暴露于胶片上分析结果（图 2.2.2）。

支持方案 连接分析准备修饰的寡核苷酸

修饰的寡核苷酸引物是商业化的或者可以在实验室用自动的 DNA 合成仪来制备。

生物素标记的引物

在合成时 5′标记生物素的结合。一个 5′ 生物素亚磷酰胺在合成时标记到引物上。具体方法请参考 DNA 合成仪说明书。

合成后加生物素标记。一个 aminohexylphosphate 连接子在寡核苷酸合成时被掺入（遵照生产厂家的说明书），去保护后加生物素标记，其反应体系包括 100μl（200μmol/L）的寡核苷酸，50μl 的 50mmol/L 的用二甲基甲酰胺溶解的生物素-*N*-hydroxysuccinimide 酯和 50μl 的 1mol/L 的碳酸氢钠/碳酸钠缓冲液，pH9.0（附录 1）。室温下孵育 1h。生物素标记的引物用反相高效液相色谱进行纯化，选用 C18 柱子，30min 三乙胺乙酸盐/乙腈 90：10～60：40 的线性梯度，1ml/min 的流速。

磷酸基和地高辛标记的引物

合成后加地高辛标记。寡核苷酸引物合成时 3′端以胺基连接在柱子上，在 5′端与亚磷酰胺的磷酸根反应。去保护后，这个引物的 3′胺基团与 40mmol/L 地高辛-3-*O*-甲基羰基氟-ε-氨基己酸 *N*-羟基琥珀酰亚胺酯反应，方法同以上关于生物素的描述，但反应需要孵育过夜。修饰的引物用反相高效液相色谱进行纯化。

用 3′端加尾法将引物标记地高辛-11-UTP。引物以在 5′端不断连接亚磷酰胺磷酸根的方式合成，接着去保护，引物被脱水至干粉状，重新溶解在水里。将 3′端进行标记的反应方法如下：将 500pmol 磷酸化的引物、4μl 5×末端转移酶阻滞缓冲液、2μl 地高辛-11-UTP、1μl 40μmol/L dATP 混合，加水至 19μl。加入 1μl（35～70U）的末端转移酶，于 37℃孵育 1h 到过夜。终止转移酶必须在 65℃孵育 15min 以灭活。因为多个地高辛分子被加入到引物，这种方法可以产生比通过直接化学修饰（以上）的方法更强的信号。地高辛标记的试剂和用于寡核苷酸标记的试剂盒可以从 Boehringer Mannheim 公司买到。

参考文献：Nickerson *el al.*，1990；Wiedmann *et al.*，1994

编者：Deborah A. Nickerson，Wendy Ankener，Claire Delahunty，and Pui-Yan Kwok

单元 2.3 自动荧光的分型方法

当有大量的样本，多个微卫星标记需要分型时，需要本单元描述的分型方法。例如，用全基因组的方法做一个疾病的连锁分析研究，需要在 500 个个体里检测 300 个标记，这样就要 150 000 次基因分型。本单元描述的技术是用 Perkin-Elmer 的自动 DAN 测序系统，但也可以修改用于其他的自动荧光测序系统。

基本方案　PCR 扩增 SSLP 用于自动荧光分型

在选择引物时有两个基本的要素。第一，要能够混合用同样的荧光染料标记的引物，这样每个位点的产物在丙烯酰胺胶上分析时将不会重叠。在每个多重的配置里每个单种颜色位点的等位基因片段的大小都不能重叠。作者允许在用两个核苷酸重复时标记之间有 20bp 的空隙，在用三核苷酸重复时标记之间有 40bp 的空隙。第二，引物的扩增产物的质量能够允许快速而且准确读峰和分型。几个公司——如 Perkin-Elmer 和 Research Genetics 提供了人类基因组的定位的图谱可以优化标记的密度和性能。

注意：涉及 PCR 的实验需要小心防止污染。

材料（标√的条目参见附录 1）

√TE 缓冲液里保存的 4ng/μl 的患者 DNA 样本（见缓冲液的配方）
10×PCR 缓冲液（Perkin-Elmer）
√10mmol/L 4dNTP 混合液（见配方或从 Perkin-Elmer 购买）
25mmol/L $MgCl_2$
20μmol/L 荧光染料标记的每个微卫星标记的正向引物
20μmol/L 每个微卫星标记的正向引物
5U/μl 金牌 Ampli *Taq* DNA 聚合酶（Perkin-Elmer）
96 孔板（Robbins）
烤干炉（可选）
多道排管吸液器和消毒的试剂盘
96 孔可剥离的盖子（Robbins）或者 96 孔塑料封膜（Costar）
5ml 和 50ml 的管子
能操作 96 孔板的热循环仪

1. 在一个 96 孔板中按需要的顺序排列 4ng/μl 的患者 DNA 样本（如将家系的成员放在一组这样可以在同样的胶上显示）。排列样本从列的 A1 到 H1，从行 1～12 以方便胶上样。
2. 每个患者 DNA（20ng）吸取 5μl 到恰当的孔中，根据需要扩增的标记数来重复。

   短期的保存可以盖上板子或者应密封放冰箱里，保存几天。长期保存时在 70℃ 烤炉里 15～30min 烤干 DNA，室温下保存。PCR 前于 95℃10min 再水化。
3. 为每个引物特异性的反应混合液标记 5ml 的管子，为减去引物的其他主要的反应混合液标记一个 50ml 的管子。所有的管子上标记包括 $MgCl_2$ 的浓度和引物的名字。
4. 50ml 的管子里，为所有的板子准备除了引物的主要的反应混合液。将板子和所有的成分置于冰上，每个板子加入下面的成分（基于 110 个反应/板子，允许损失）：

   220μl 10×PCR 缓冲液；
   220μl 10mmol/L 4dNTP 混合液；
   220μl 25mmol/L $MgCl_2$；
   220μl 5U/μl 金牌 Ampli *Taq* DNA 聚合酶；
   715μl H_2O（或者 1265μl 如果板子上是烤干的 DNA 的话）；

总容量＝1595μl/板子（或者 14. 5μl/个反应）。

这个反应混合液是假定所有的引物需要 2. 5mmol/L $MgCl_2$，但是 $MgCl_2$ 可能需要优化，如果引物需要的 $MgCl_2$ 不同，主要的反应混合液就必须单独配制。任何 $MgCl_2$ 的改变都通过调整水的量来补充。

5. 将 1595μl 的主要反应混合液分装到每一个 5ml 的管子里，每个管子里加 27. 5μl 的恰当的荧光标记的正向引物和 27. 5μl 的恰当的反向引物，配成引物特异性的 PCR 混合液。

   根据需要来保持引物处于解冻状态，将引物放置于冰盒里，盖上盖子防止荧光标记受热散失。

6. 将引物特异性的 PCR 混合液吸入一个多道吸液器试剂盘里，用引物对扩增的标记的名字标记 96 孔板，如 D2S126。从每个引物特异性的混合液里吸去 15μl（如果板子是烤干的话吸 20μl）到恰当的包含有要分型的 DNA 的 96 孔板中。

7. 板子样本加好后，盖上盖子或者用密封膜封好，放入热循环仪。根据引物的情况执行正确的程序。

激活：	12min	95℃
16 个循环：	30s	94℃
	30s	66℃，每个循环降低 1℃
	30s	72℃
22 个循环：	30s	94℃
	30s	50℃
	30s	72℃
最后一步：	无限期	4℃

   在第一个 16 个循环里退火温度从 66℃ 降到 50℃ 以给大多数的产物提供一个可选的扩增条件，然后继续扩增达到一定水平使能在胶上检测出来。对于每个引物对、DNA 模板和热循环来说，PCR 条件，特别是扩增的温度都是需要优化的。

8. 将 PCR 产物放于冰上，准备 PCR 产物混合物（支持方案 1），或者将 PCR 产物根据需要放于冰箱（只用于保存 PCR 产物）内。在丙烯酰胺胶上跑 PCR 产物混合物（支持方案 2）。

支持方案 1　混合用于基因分型的荧光标记的 PCR 产物

多重反应组里每个标记的数量是根据在琼脂糖胶上检测每个位点的 PCR 产物的检测结果来决定的。从每个板中最少取两个样本用于分析。

材料

荧光标记的 PCR 产物（基本方案）

4×BB 载样染料：0. 167%（*m/V*）溴酚蓝/30%（*V/V*）甘油

50μg/ml DNA 分子质量标记（如 DNA Mass Ladder、Life Technologies）

Genescan 500 Tamra 分子质量标记（Perkin-Elmer）

用于96 孔板的 Beckman CS-6 离心机和 PTS-2000 振荡仪（或者相同功能的其他仪器）

96 孔板

多道移液器

96 孔塑料板密封膜（Costar）

90℃烤炉

1. 如果荧光标记的 PCR 产物板是冷冻保存的且有凝块贴在盖子上或者封口膜上则须用带 96 孔板套板的 Beckman CS-6 离心机室温下离心几秒钟，使凝块回到管中。
2. 切一片大约 4cm×20cm 的石蜡膜，为上样的每个样本点 2μl 4×BB 载样染液在石蜡膜上。从阴性和阳性对照孔中吸 8μl PCR 产物到相应的 2μl 4×BB 点上，上样前混合每个样本，每行琼脂糖胶点一道 5μl 的 50μg/ml DNA 分子质量标记。
3. 2%琼脂糖胶上样 10μl 包括 0.2mg/ml 的溴化乙锭（附录 3G）。90mV，跑胶 20min 直到带大约跑到胶的一半停止。
4. 胶照相以确定带的亮度（带越亮，PCR 反应越强，产物越多），根据板子上样本引物的名字标记照片。
5. 检查组里荧光染料标记的每个 marker，以决定用在表 2.3.1 里显示的每种染料混合的量，调整产物的量到正好反映琼脂糖胶的结果。按混合量从低到高排列 PCR 产物以分组。如果 PCR 产物板在上样和混合之间是在冰箱里保存的，则 800*g* 离心。

   每个微卫星标记的引物都是特异性的染料标记的，引物可以被 1～3 种染料：Fam（6-羧基荧光素）、Hex（4，7，2′，4′，5′，7′-六氯荧光素-6-羧基荧光素）或者 Tet（4，7，2′，7′-四氯荧光素-6-羧基荧光素）标记。这些染料的亮度不同，Hex 大约是 Fam 或 Tet 亮度的一半。需要一些预实验来决定混合的量，可以根据所用的仪器变化。混合太多的产物将导致胶超载，混合太少的量将导致太少的信号。在 ABI 的仪器上 PCR 产物的荧光范围可以为 200～2000 个荧光单位。

表 2.3.1　建议混合量

染液[a]	带的亮度	建议混合量/μl
Fam	无带	0.1
	浅带	0.04
	好的	0.02
	亮带	0.01
Tet	无带	0.1
	浅带	0.04
	好的	0.02
	亮带	0.01
Hex	无带	0.2
	浅带	0.08
	好的	0.04
	亮带	0.02

a. 缩写：Fam，6-羧基荧光素；Hex，4，7，2′，4′，5′，7′-六氯荧光素-6-羧基荧光素；Tet，4，7，2′，7′-四氯荧光素-6-羧基荧光素。

6. 标记混合的板子和要上样跑胶的板子，当所有的 PCR 产物板被安排在工作的范围，小心地移去板子的盖子或者密封膜。检查是否所有的板子的方向都摆放正确，因为所有的 PCR 产物板都要被混合，所以混合的和要跑胶的板子有一样的位置。

7. 对于混合的板子，根据每个孔的最终量是 200μl 加一定量的水。用多道的移液器，从每个 PCR 产物的板子（每个标记）转移合适的量到混合的板子。当转移完所有的 marker，混合板子的每个孔。

   见表 2.3.2，假定混合 9 个分子标记的组，在这个例子里，所有跑胶了的标记总 PCR 产物是 0.47μl，不能超过 2μl，因为过量的 PCR 盐会干扰电泳。

8. 从混合的板子中转移 2μl 到跑胶的板子中，如果稍后再上样跑胶，则用密封膜密封跑胶的板子，放冰箱里。如果同一天上样，执行第 9 步前配置好跑胶装置（支持方案 2）。冰箱里保存每个标记的 PCR 产物直到胶上的分型数据被成功收集，以防重复。
9. 加 1μl 的 Genescan 500 Tamra 分子大小标准到每个要上样的孔中。用密封膜密封板子，室温下 800*g* 离心板子几秒，以去除孔中的气泡。
10. 在 90℃烤炉中加热 5min（长时间可能会导致板子融化），加热后，立即放于冰上冷却样本。执行电泳（支持方案 2）。

表 2.3.2 举例说明准备混合的组

标记	丙烯酰胺胶需要的最终量/μl	从 PCR 产物板里取出用于混合的量/μl
1	0.01	1
2	0.02	2
3	0.08	8
4	0.1	10
5	0.02	2
6	0.08	8
7	0.1	10
8	0.04	4
9	0.02	2
总共	0.47	47（+153μl H_2O）

支持方案 2 混合好的 PCR 产物电泳

材料（标√的条目参见附录 1）

要上样的板子（支持方案 1）

√6%（*m*/*V*），24cm well-to-read 丙烯酰胺胶

√1×TBE 电泳缓冲液

自动荧光测序仪（例如，ABI 可检测 4 种颜色的 373 或者 377，Perkin-Elmer；或者 Pharmacia，LICOR 的单种颜色检测）

Genescan 672 收集、分析和分型的软件（Perkin-Elmer）

60ml 的进样针

塑料指示带（Perkin-Elmer，可选）

微量移液器

上样的微量 tip

1. 打开测序仪和电脑。
2. 把 6% 24cm well-to-read 丙烯酰胺胶的夹子去掉，将多余的胶用水冲洗干净，把玻

璃板上灰尘弹掉。缓慢地移去梳子，用水冲洗掉多余的丙烯酰胺胶。晾干玻璃板或者在干净的 Kimwipe 中烤干玻璃板。

对于一个 96 孔需上样的板子，下面描述的过程使用的是 3 个 32 孔的胶，2 个 48 孔的胶同样可以使用。

3. 打开自动测序仪前面舱的门，把低的缓冲液槽子装在舱的下面，将一个干净的胶放在舱里，使其平面正好对着激光室，胶板的底部放在低的槽子的对面。确保胶的方向是正确的，有耳的一面向里。
4. 看一下胶扫描的区域是否有黏着在板子上的胶碎片，如果需要，用一块潮湿的 Kimwipe 将其擦干净。用黑色的间隔片将胶锁在正确的位置，关上舱门。
5. 调整光电倍增管（PMT）的电压，用 373A 键区，选择 Main Menu，选 Calibration，然后选 Configure 核查运行的参数。检查默认的参数，如果需要可进行修改。

   运行时间：5h 30min 1070V

   出现数据通信的错误时运行不会终止

   滤过器轮 B

   激光功率是 40mA/30mW
6. 用鼠标和键盘在 Genescan 672 收集软件的菜单窗口中选择 Scan 和 Map，在 373A 主菜单上用主键区选择 Start Pre-run 然后 Plate Check。选择 Full Scan 开始扫描胶板。

   如果读胶的区域是干净的，扫描将会看起来像平线，在胶的宽面的图将会全是灰色。如果扫描有明显的峰和图上有有颜色的峰，那是在玻璃板的激光读数的区域有碎胶或灰尘。这时必须打开电泳舱，将玻璃板的两面都擦干净。用潮湿的 Kimwipe 擦时最好从水平方向擦拭。重新按照以上描述检查胶是否干净，如果需要重复擦拭直到胶读数的区域是干净的。

   扫描如显示一个峰包括 4 种颜色，这是由于胶的不规则造成的，这是不能够被擦干净的。然而，随着缓冲液在胶里跑这个问题会自动消失。如果遇到这样奇怪的峰，注意扫描窗口峰的 x 轴，这个值和信道数是等同的，可以用于决定哪一道人造峰将被显示。根据信道值决定 36 孔梳子的道数，如果胶不规则则在上样时跳过这道。
7. 用鼠标指示扫描的最低的颜色行，扫描的左下角是 x 轴和 y 轴的坐标。检查最下面一行 y 轴的 PMT 值。

   y 值应该在 800 的 20 个单位内，y 值是根据 373A 键区里设置菜单的 PMT 的值调整的。设置菜单可通过主菜单里的 Calibration 达到。升高 PMT 值亦升高 y 值。
8. 重复第 2～7 步直到每个胶板都在电泳舱上装置好，都是干净的扫描区域和正确的 PMT 值。
9. 通过旋转螺旋夹直到垫圈变平和用手旋紧夹子将上面的缓冲液槽安到安全的玻璃板上。加 1×TBE 电泳缓冲液到上面的缓冲液槽，小心操作勿将缓冲液滴到读数的区域否则要再擦干净并重新扫描。用 1×TBE 缓冲液灌上面的缓冲液槽直到高于最高的孔大约 0.5cm 和距最上面的舱大约 1cm，灌下面的缓冲液槽直到距离槽的顶大约 1cm。确保下面舱的电线是覆盖着的，检查上面缓冲液槽的垫圈是否密封好。

   每台仪器大约需要 1.5L 的 1×TBE。
10. 用一个 60ml 的注射器，用 1×TBE 冲洗胶孔。把针头的顶部正好放在上面的缓冲

液槽的两块玻璃板之间。

11. 如果需要，将一个塑料的指示带放到玻璃板的外面，这样相应的胶孔的顺序可以显示。检查胶是否有断掉的孔沿、气泡或者坏的胶孔。注意如果有任何胶孔有这些问题都不能上样。
12. 将要上样的板子放在冰盒里，将开始 4 列（A1～A4）的塑料封条扯掉。将微量移液器调到 3μl，在孔 A1 里吸取样本，将 tip 的平面放到两块玻璃板之间，大概一半伸入第一个胶孔里，缓慢的将样本打入胶孔，拔出 tip。小心胶孔别太满，防止样本流入下一个胶孔里。如果相邻的胶孔污染了，则跳过它，做个标记。
13. 继续从上样板里吸取样本上样，直到 H1 孔，然后移到下一列从 A2 孔到 H2 孔。将板子的前 4 列上到前三块胶，如果胶上样错了，要在胶孔上注明上错的那一道。
14. 当胶全部上样完了，把塑料指示带从玻璃板上取下，插上上面和下面缓冲液槽子的电源，关上电泳舱的门。在 373A 的测序键区，按下 Choose Run 按钮，选择 Genescan Run 开始电泳，立即用鼠标指示绿色的 Collect 按钮开始 Genescan 收集。

    Collect 按钮将开始闪烁以核实收集开始，如果绿色的按钮没有开始闪烁，按下 373A 键区的 Stop Run 按钮，从有经验的人那里得到帮助。
15. 重复第 9～14 步将 A4～H8 和 A9～H12 上样到另外两块胶上，当所有的三个仪器全部上样完成、Genescan 收集开始时，最后检查收集的按钮是否闪烁。当跑胶完成时，检查错误。

    Genescan 在收集过程中不应该有任何的错误，373 键区应该显示执行时间用了 5.5h。
16. 关掉 373A 测序仪，打开电泳舱的门，拿住胶板，上缓冲液槽仍在上面，仍是对着激光室，打开两边的插销将黑色的带子从胶上撕掉。将胶和上缓冲液槽一起拿出电泳舱，拿到水槽处倒掉缓冲液，将上缓冲液槽从胶上取下。
17. 小心地将下缓冲液槽从电泳舱里取出倒掉缓冲液，冲洗两个槽子后放到测序仪下面。用潮湿的纸巾将电泳舱内洒的液体擦干净，关上电泳舱的门，其他的胶板重复此步骤。
18. 分析胶，根据生产厂家的说明书用 Genescan Analysis 和 Genotyper 软件分析等位基因型。

参考文献：Litt and Luty，1989；Weber and May，1989

编者：Jeff Hall and Elizabeth Nanthakumar

单元 2.4 用微阵列的方法分型单核苷酸多态

注意：下面的操作包括任何溶液的成分都只能用分子生物级的水（如无核酸酶；BioWhittaker）。

战略计划

为了避免污染，要尽量防止物品从一个地方移动到另一个地方，下面是仪器和溶液

的一个清单，应该在实验前都放置到指定的地方。

PCR 前清洁的房间

微量离心机
1.5ml 微量离心管
微量移液器和相应的 tip：0.2～2μl、1～10μl、2～20μl、50～200μl 和100～1000μl
微量封膜“A”（MJ Research）
1～10μl 多道移液器和相应的 tip
96 孔聚丙烯 V 形底微孔板（MJ Research）
封闭和取样的铝箔盖子（Beckman）
0.2ml 细长的管子和盖，strip of 8（MJ Research）
试管架
漩涡混合器
除了目标 DNA 外的所有的 PCR 试剂

PCR 阶段的房间

微量移液器和相应的 tip：0.2～2μl、1～10μl、2～20μl、50～200μl 和 100～1000μl、5～50μl 的多道移液器和相应的 tip
带旋转桶的离心机（Sorvall）
试管架
漩涡混合器
目标 DNA、金牌 Ampli *Taq* 酶，以及 T3 和 T7 引物

主要的实验室

低拷贝的区域

1～10μl 的微量和多道的移液器和相应的 tip
封闭和取样的铝箔盖子（Beckman）
漩涡混合器

中拷贝的区域

微量移液器和相应的 tip：0.2～2μl
1～10μl 的多道移液器和相应的 tip
漩涡混合器

高拷贝的区域（接近循环）

100bp 的 DNA ladder（Life Technologies）
跑胶的仪器和 24 孔的 4% NuSieve 3∶1 琼脂糖凝胶（FMC Bioproducts）
上样的染液

1.5ml 微量离心管（USA Scientific）
微型-10 微型集中器（Millipore）
微量移液器和相应的 tip：0.2～2μl、1～10μl、2～20μl、50～200μl 和 100～1000μl
微量离心机
20×TBE 阻滞溶液（BioWhittaker）
热循环仪（例如，MJ Research DNA Engine 或者 Tetrad；Perkin Elmer 2400、9600 或者 9700）
漩涡混合器
所有的 PCR 产物和杂交、清洗和染色的试剂

基本方案 1 用等位基因特异性的微阵列方法进行 SNP 分型

GeneChip HuSNP 探针阵列包括代表每 1494 个 SNP 标记的两个等位基因的寡核苷酸探针。探针阵列的图解见图 2.4.1。更多的信息参考随 HuSNP array 和试剂盒（Affymetrix）一起的 HuSNP Mapping Assay 用户手册。

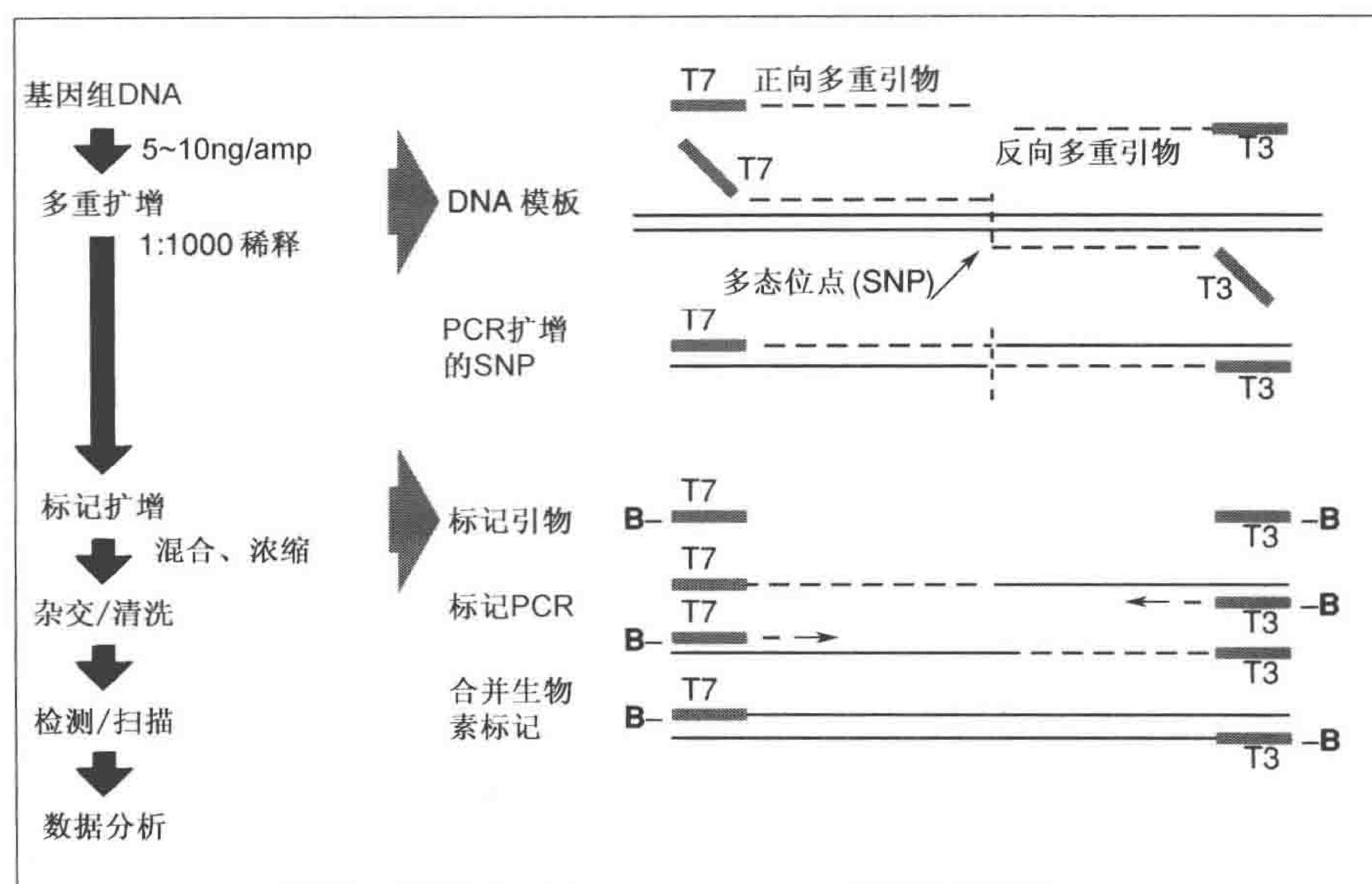


图 2.4.1 HuSNP 阵列。多重扩增阵列包括为基因组 DNA 要扩增的每个 SNP 设计的标记特异性的引物；末端有 T7 和 T3 序列的 SNP 特异性引物；相应的，所有的多重 PCR 产物有同样的 T7 和 T3 序列。生物素标记的 T7 和 T3 引物和在多重 PCR 产物末端的普通 T7 和 T3 序列配对扩增标记扩增阵列，相应的，所有的标记 PCR 产物的末端都应该有一个生物素分子。

材料

GeneChip HuSNP 试剂盒（Affymetrix）
　多重引物池 1～24
　用生物素-T7 标记的引物

用生物素-T3 标记的引物

对照寡核苷酸 B1

HuSNP Reference DNA

PCR 主要混合液（表 2.4.1）

表 2.4.1　PCR 主要混合液 Ⅰ[a]

溶液	1 个反应/μl	28 个反应/μl	终浓度[b]
10×缓冲液Ⅱ	1.25	35	1×
25mmol/L $MgCl_2$	2.5	70	5mmol/L
25mmol/L dNTP	2.5	70	0.5mmol/L
5U/μl 金牌 Ampli *Taq* 酶	0.25	7	0.1U/μl
H_2O	1.75	49	
最终量	8.25	231	

a. 这是一个 DNA 样本的配方；b. 终浓度是指多重 PCR 扩增反应的终浓度。

10×缓冲液Ⅱ，24mmol/L $MgCl_2$和金牌 Ampli *Taq* DNA 聚合酶（Perkin Elmer 同时提供）

2.5mmol/L dNTP：每 100mmol/L 的 dNTP 阻滞液（Pharmecia Biotech）25μl/900μl H_2O；保存于－20℃

4ng/μl 的基因组 DNA

PCR 主要混合液Ⅱ（表 2.4.2）

表 2.4.2　标记 PCR 主要混合液 Ⅱ[a]

溶液	1 个反应/μl	28 个反应/μl	终浓度[b]
10×缓冲液Ⅱ	2.5	70	1×
25mmol/L $MgCl_2$	4	112	4mmol/L
25mmol/L dNTP	4	112	0.4mmol/L
10μmol/L 生物素-T7 引物	2	56	0.8μmol/L
10μmol/L 生物素-T3 引物	2	56	0.8μmol/L
5U/μl 金牌 Ampli *Taq* 酶	0.5	14	0.1U/μl
H_2O	7.5	210	
最终量	22.5	630	

a. 这是一个 DNA 样本的配方；b. 终浓度是指标记 PCR 扩增反应的终浓度。

4% Nusieve 琼脂糖胶（可选；FMC Bioproducts）

杂交混合液（表 2.4.3）

5mol/L 四甲基铵氯化物（TMAC；Sigma）

1mol/L Tris · Cl，pH 7.8（附录 1）

1% Tween 20（Pierec）：用水彻底混合，用 0.2μm 的过滤器过滤；保存在室温

0.5mol/L EDTA，pH 8.0（附录 1）

10mg/ml 的鲱鱼精 DNA（附录 1）

50×Denhardt 的溶液（附录1）

表 2.4.3　杂交混合液

溶液	量[a]/μl	终浓度
5mol/L TMAC	81.00	3mol/L
对照寡核苷酸 B1[b]	1.35	2nmol/L
1mol/L Tris·Cl，pH 7.8	1.35	10mmol/L
1%Tween 20	1.35	0.01%
0.5mol/L EDTA，pH8.0	1.35	5mmol/L
10mg/ml 鲱鱼精 DNA	1.35	100μg/ml
50×Denhardt 溶液	13.5	5×
H_2O	3.75	
最终量	105.00	

a. 量特异性的指满足一个样本的量；b. 这个杂交对照的信息可参照 Affymetrix HuSNP Mapping Assay 用户手册。

扩增反应管

低速带旋转桶，滴定板的离心机

热循环仪（例如，MJ Research DNA Engine 或者 Tetrad；Perkin Elmer 2400、9600 或者 9700）

96×1ml 深孔的滴定板和铝箔盖子（Beckman）

微型-10 微型集中器（Millipore）

10μl 非移液器配套的 tip（如黄色的 tip）

GeneChip HuSNP 探针阵列（Affymetrix）

GeneChip 杂交炉 320 或者 640，44℃（Affymetrix）

注意：在 PCR 前清洁的房间里要绝对没有模板 DNA 或者 PCR 产物；建议戴手套和穿无菌衣以减少 PCR 的交叉污染。

1. 每个基因组 DNA 样本，标记 24 个扩增反应管，其中一个准备装每个的 24 多重引物池，用 96 孔板或者排列成 8 管一排的格式。每个多重引物池中取出 3μl 到相应的标记的扩增反应管。
2. 在前 PCR 清洁房间里为 28 个反应准备足够的 PCR 主要混合物Ⅰ（表 2.4.1）。
3. 在 PCR 阶段房间里，为每个基因组 DNA 模板加 33.75μl 的 4ng/μl 基因组 DNA（足够用于 27 个反应）到一个 222.75μl 量的 PCR 主要混合物Ⅰ里。漩涡混合彻底。往装有 3μl 多重引物池的 24 孔或管子中（第 1 步）各加 9.5μl，封好管子或板子，轻轻地漩涡混匀，在带旋转桶的离心机上离心（<2000r/min）。

   每 12.5μl 的反应液里包含 5ng 的基因组 DNA 和 50nmol/L SNP 特异性的引物。
4. 在高拷贝的区域，对于 MJ 的热循环仪用下面的条件开始多重 PCR 扩增反应（对于 Perkin-Elmer 的仪器，退火 50s，用或不用梯度）。

起始步骤：	5min	95℃	（变性）
30 个循环：	30s	95℃	（延伸）

	55s	52℃＋0.2℃/循环	（用梯度退火）
	30s	72℃	（延伸）
5 个循环：	30s	95℃	（延伸）
	55s	58℃	（退火）
	30s	72℃	（延伸）
1 个循环：	7min	72℃	（最后延伸）
最后一步：	无限期	4℃	（保持）

5. 在前 PCR 清洁的房间里，为每个基因组 DNA 样本准备和标记第二组 24 个扩增反应管并为 28 个反应准备足够的标记的 PCR 主要混合液 Ⅱ，混合液无金牌 Ampli *Taq* 酶（表 2.4.2），漩涡彻底混匀。
6. 在 PCR 阶段房间里立即加金牌 Ampli *Taq* 酶到标记好的 PCR 管里，分装 22.5μl 的完全的主要混合液 Ⅱ 到新的标记好的管子/板子中（第 5 步），将管子转移到主要实验室的低拷贝的区域（远离热循环仪）。
7. 用 1.0ml 的分子级水（无核酸酶的）装满 96×1ml 深孔微量滴定板的 24 个孔。

   为了减少 PCR 的交叉污染，可以在前 PCR 清洁的房间里用水装满一个深孔微量滴定板，用铝箔盖子盖好，再拿到主要实验室。
8. 继续完成多重 PCR 反应（第 2 步），带旋转桶的离心机上低速（大约 1000*g*）离心多重 PCR 反应板。
9. 在主要实验室的中拷贝区域，小心地移去管子的盖子，用一个 1～10μl 的多道移液器和相应的 tip，加 1.0μl 的 24 个多重扩增反应液到装有水的板子中，用铝箔盖子紧紧地封好孔，轻轻地漩涡混匀、离心。
10. 在主要实验室的低拷贝区域，用一个 1～10μl 的微量移液器（最好的多道的）分装 2.5μl 的 1∶1000 的稀释液（第 9 步）到标记好的装有 PCR 主要混合液 Ⅱ（第 6 步）的扩增管子/板子中。用盖子封好管子，离心。
11. 用下面的程序在热循环仪上开始标记好的 PCR 扩增反应（为 MJ 和 Perkin-Elmer 热循环仪优化）。

起始步：	8min	95℃（变性）
40 个循环：	30s	95℃（延伸）
	90s	55℃（退火）
	30s	72℃（延伸）
1 个循环：	7min	72℃（最后延伸）
最后一步：	无限期	4℃（保持）

12. 可选：为了确认 PCR 扩增反应，在主要实验的高拷贝区域，每个反应取 1.5μl 在 0.4%的 NuSieve 琼脂糖（附录 3G）上分析。

    所有的 24 道都应该看见大约 100bp 的带簇。
13. 在主要实验室的高拷贝区域，每个 PCR 产物取 23μl，在两个微型-10 微型集中器中混合，室温 13 000*g* 微量离心 20min，或者直到量减少到至少 10 倍（总量小于 60μl）。通过反转过滤器重新获得样本，3 000*g* 微量离心 3min，混合浓缩物，通过加水调整量到 60μl。取出 30μl 用于杂交，其他保存在－20℃。

14. 根据表2.4.3给的量准备杂交混合液，如果操作多个样本，要准备多一个样品的杂交液，只弥补吸取时的误差。
15. 在一个微量离心管里，混合30μl浓缩的标记DNA（从第13步来）到105μl的杂交混合液里。95℃ 5～10min变性样本后，将管子很快放到冰水浴中，冰上孵育2min，离心。
16. 插入一个10～200μl的非移液器配套的tip到HuSNP探针微阵列的上面的隔膜上作为排气口。用一个250μl的非移液器配套的tip，在样本管子里混匀杂交样本几次（也就是重新悬浮溶液外的其他材料）并注射样本到探针阵列隔膜的底部。
17. 44℃于GeneChip杂交炉320或640上杂交探针阵列过夜（大约16h），在转架上以40～50r/min的速度旋转。然后按HuSNP Mapping Assay操作手册描述的洗、染和扫描微阵列。
18. 开始分析GeneChip数据，给每个探针阵列一个实验名字，产生一个.exp的文件。扫描探针阵列后生成一个.dat的文件或者一个图文件。

    从.dat文件，软件通过每个孔划分界线自动生成一个.cel文件，在包含唯一的寡核苷酸序列的阵列的表面一个探针孔是一个区域。软件在每个探针孔里平均像素亮度，以产生一个.cel文件。
19. 用合适的探针阵列的GeneChip算法分析一个.cel文件，产生数据输出文件，.cap文件。

    自动化的分析为那些符合标准的标记提供了分型的名称（AA、AB或者BB），分析的最后结果是一个在.chp文件里的清单，可以保存成.txt文件输入到数据库以便以后的分析。

基本方案2 用普通的微阵列和单碱基延伸的方法分型SNP

阵列的示意图见图2.4.2，关于Affymetrix GenFlex Tag阵列设计的进一步的信息可以从Affymetrix的网页（http://www.Affymetrix.com）上得到。

材料（标√的条目参见附录1）

20ng/μl的基因组DNA

PCR混合液（表2.4.4）

10×缓冲液Ⅱ、25mmol/L $MgCl_2$和5U/μl金牌Ampli *Taq*（Perkin Elmer；一起提供）

25mmol/L dNTP：每100mmol/L dNTP溶液（Pharmacia Biotech）25μl/900μl水；－20℃保存

每个SNP标记的每个位点特异性的引物5μmol/L

10U/μl的外切核酸酶Ⅰ（Amersham Life Sciences）

1U/μl虾碱性磷酸酶（Amersham Life Sciences）

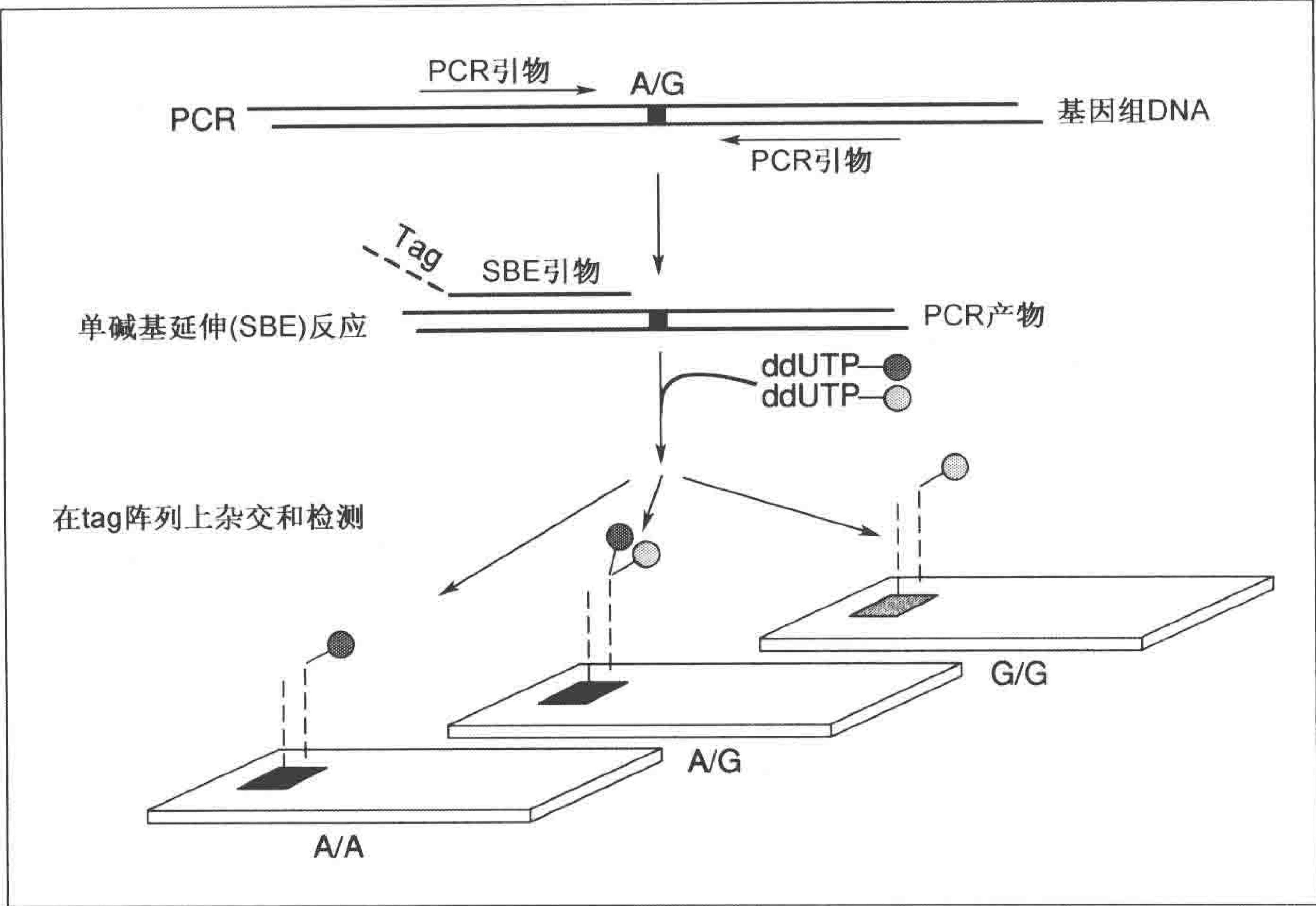


图 2.4.2　TAG-SBE 基因分型阵列。基因组 DNA 的每个要扩增的 SNP 都设计了标记特异性的引物；同样多态碱基（如 A/G 的 SNP）的 SNP 已经混合。双链 PCR 产物是 SBE 延伸反应的模板，每个 SBE 引物的 5′端与在阵列上合成的一个统一的 tag 互补，3′端与基因组的序列互补，SBE 引物终止于 SNP 多态位点前一个碱基。因此，每个 SBE 引物都是唯一的与阵列上的特异的 tag（位置）相关的。多个标记的相应 SBE 引物都加入到一个反应管里，在用不同荧光标记的 ddNTP 的存在下进行延伸反应，如一个 A/G 的双等位基因标记在生物素标记的 ddUTP 和荧光素标记的 ddCTP 的存在下进行延伸。然后混合标记的多个 SBE 反应产物，杂交到 tag 阵列上。根据相应的基因型 AA、AG 和 GG，显示有三种杂交模式。

表 2.4.4　多重位点特异性扩增 PCR 混合液

溶液	量/μl	终浓度
10×缓冲液Ⅱ	2.5	1×
25mmol/L $MgCl_2$	5	5mmol/L
25mmol/L dNTP	1	1mmol/L
5μmol/L（每个）引物混合物	2.5	每个 0.5μmol/L
20ng/μl 基因组 DNA	2.5（总共）	2ng/μl[a]
5U/μl 金牌 Ampli *Taq* 酶	0.4	0.08U/μl[b]
H_2O	11.1	
最终量	25	

a. 总共 50ng 基因组 DNA；b. 总共 2U 金牌 Ampli *Taq* 酶。

延伸混合液（表 2.4.5）

SBE 引物混合液：20nmol/L 每个标记的用 TAG/SNP 混合的 SBE 引物

5×热测序缓冲液（Amersham Life Sciences）：260mmol/L Tris · Cl/65mmol/L $MgCl_2$，pH 9.5

1nmol/μl 荧光素-N6-ddNTP（New England Nuclear）

生物素- N6-ddNTP、生物素-11-acyclo-ddCTP或者生物素-N6-ddATP（NEN）

1 nmol/μl 保持两个 ddNTP

6.4U/μl 的热稳定测序金牌酶（Amersham Biosciences）

100μg/ml 肝糖（Boehringer Mannheim）

8mol/L LiCl

纯乙醇，－20℃

表 2.4.5 延伸混合液

溶液	量/μl	终浓度
模板	6.0	
SBE引物混合液（每个引物 20nmol/L）	2.5	每个 1.5nmol/L
5×热稳定序列缓冲液[a]	6.6	1×
1nmol/μl 荧光素-ddNTP	0.8	25pmol/μl
$x$nmol/μl 生物素-ddNTP[b]	0.5	7.6或者 3.8pmol/μl[b]
1nmol/μl 其他两种冷-ddNTP	每种 0.3	每种 10pmol/μl
6.4U/μl 热稳定金牌序列酶[c]	0.4	0.08U/μl
H_2O	15.6	
最终量	120.0	

a. 260mmol/L Tris·Cl，pH 9.5/65mmol/L $MgCl_2$；b. x=0.5nmol/μl 生物素-ddUTP 或者生物素-11-acyclo-ddCTP（最终 7.6pmol/μl）；x=0.25nmol/μl 生物素-ddATP（最终 3.8pmol/μl）；c. 总共 2.56U 热稳定序列酶。

√包含 0.5mg/ml 的乙酰 BSA 的 6×SSPE-T（见配方）

杂交混合液（表 2.4.6）

5mol/L 四甲基铵氯化物（TMAC；Sigma）

12×MES 缓冲液，pH 6.7（附录1）

1% Triton X-100

10mg/ml 鲱鱼精 DNA（附录1）

5nmol/L 荧光素-c213 对照寡核苷酸

20mg/ml 乙酰基 BSA

表 2.4.6 杂交混合液

溶液	量/μl	终浓度
5mol/L TMAC	72.0	3mol/L
12×MES 缓冲液，pH 6.7	5.0	50mmol/L
1% Triton X-100	1.2	0.01%
10mg/ml 鲱鱼精 DNA	1.2	100μg/ml
5nmol/L 荧光素-c213 对照寡核苷酸	1.2	50pmol/L
20mg/ml BSA	3.0	500μg/ml
准备好的样本	29.4	
最终量	120.0	

√1×SSPE-T

√染色液（新鲜的）

S-300 柱子（Pharmacia Biotech）
GenFlex Tag 阵列（Affymetrix）
FS400 液体台（Affymetrix）
Agilent 扫描仪（Affymetrix）
GeneChip 软件（Affymetrix）

1. 用和多态位点相同的碱基成分（如 A/G、T/C）准备 SNP 池，准备包括要扩增的每个 SNP 的位点（可到 30 个 SNP 标记）特异性的正向和反向引物各 1μmol/L 的引物混合物。
2. 根据表 2.4.4 准备位点特异性的多重 PCR 混合物到最终量为 25μl。根据下面的循环条件执行 PCR。

起始步：	10min	96℃（变性）
40 个循环：	30s	94℃（延伸）
	40s	57℃（退火）
	90s	72℃（延伸）
1 个循环：	10min	72℃（最后延伸）
最后一步：	无限期	4℃（保持）

3. 为了降解和去磷酸化没用的引物和 dNTP，加 1μl 10U/μl 的外切核酸酶Ⅰ和 1μl 1U/μl 的虾碱性磷酸酶到 25μl 的 PCR 产物里，37℃孵育混合 1h 后，100℃孵育 15min 使酶失活。根据生产厂家的指导把样本放到一个 S-300 的柱子上，用水代替缓冲液。
4. 照表 2.4.5 所示准备单碱基延伸（SBE）反应液，按下面的程序执行 SBE。

起始步：	3min	96℃（起始变性）
45 个循环：	20s	94℃（变性）
	11s	58℃（退火）
最后一步：	无限期	4℃（保持）

5. 混合所有的延伸反应液（每个 25μl）和 30μl 的 100μg/ml 肝糖混合。加 18.75μl 8mol/L LiCl 和 1125μl 的预冷到－20℃的纯乙醇混合均匀，室温下最大速度离心 15min，沉淀反应物。倒掉上清，40℃ 40min 烤干样本，再用 33μl 的水重悬样本。
6. 100℃ 10min 失活准备好的样本，然后迅速放冰上 2～5min。
7. 用包含有 0.5mg/ml 的乙酰基 BSA 的 6×SSPE-T，42℃ 15min 预杂交 Tag 阵列。用 120μl 的杂交混合液（表 2.4.6）在一个烤架上以大约 40r/min，42℃杂交 2h。

   对于每个 DNA 样本，所有的延伸混合液（A/G、A/T、A/C、G/T 和 T/C）可以杂交到一个阵列上。

8. 用 1×SSPE-T 漂洗杂交阵列 2 次，每次 10s，然后在烤架上以大约 40r/min，40℃用 1×SSPE-T 漂洗 15～20min。用 6×SSPE-T，22℃在 FS400 液体台清洗 10 次。室温下，在烤架上以大约 40r/min 的转速用 120μl 染液染色杂交阵列 15min。染色后，于 22℃用 6×SSPE-T 在 FS400 液体台清洗探针阵列 10 次。
9. Agilent 扫描仪扫描阵列，在 530nm 和 570nm 波长处捕获信号，用 GeneChip 软件将图像文件转为数字文件，用 GeneChip 软件进一步分析图像文件以给出阵列中每个探针的亮度值。

参考文献：Fan *et al.*，2000；Lindblad-Toh *et al.*，2000；Wang *et al.*，1998

编者：Nila Patil，Nassim Nouri，Linda McAllister，Hajime Matsukaki，and Thomas Ryder

单元 2.5 使用 TAQMAN 分析法的高通量基因分型

本单元讲述了 5′-核酸酶等位基因特异性分析或 TaqMan 法在单核苷酸多态（SNP）分型的应用（图 2.5.1）。

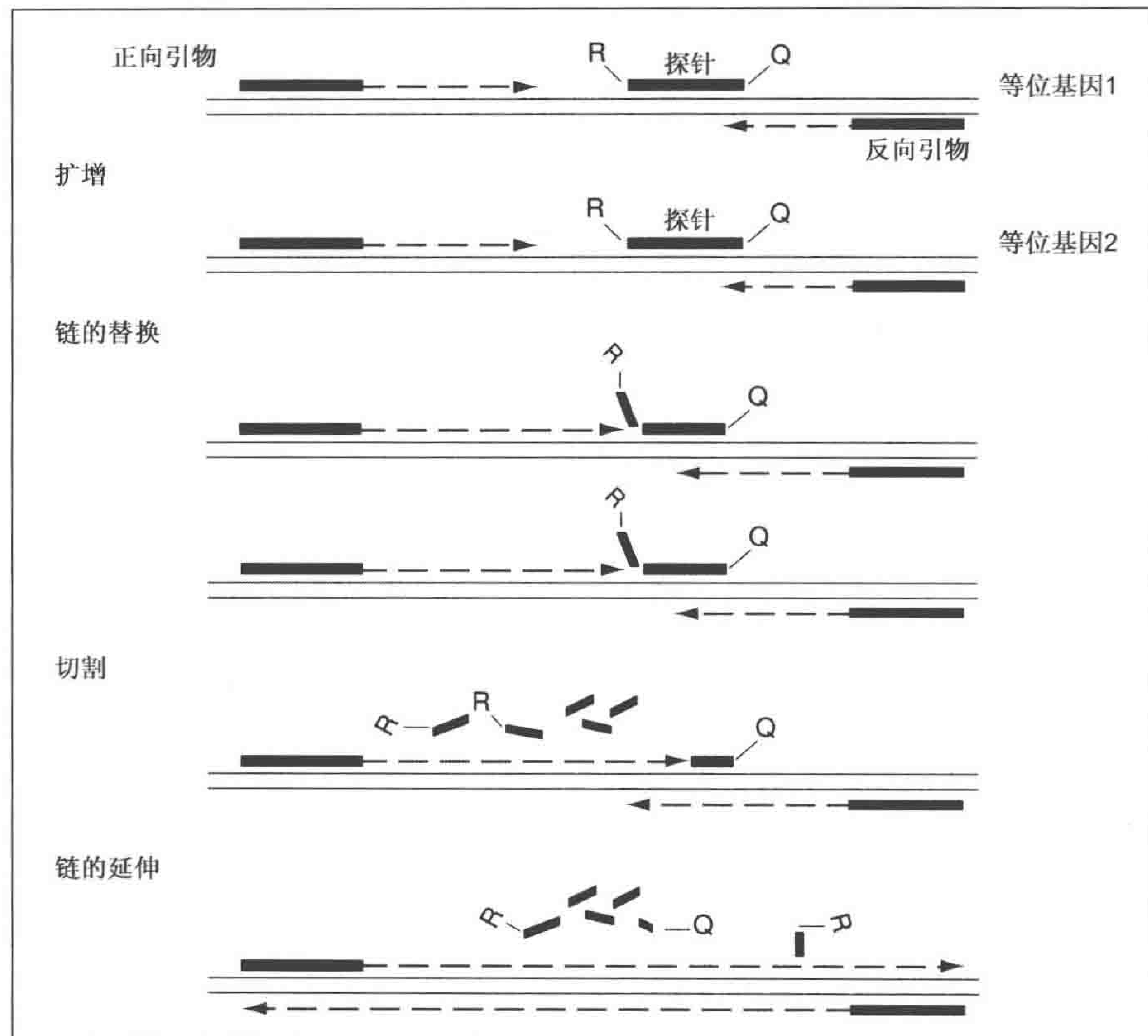


图 2.5.1 TaqMan PCR 示意图。图中所示为杂合子的情况。每个探针针对一个特定的等位基因，且被定位于 5′端的称为报道基因（R）的不同颜色的荧光染料所标记。当探针在溶液中或结合在靶标上处于退火状态时，由于 3′端普通淬火基因（Q）的存在，这些报道基因不会发荧光。但退火的探针也会被聚合酶降解，使报道基因从淬火基因中释放出来导致在 PCR 结束时可被测出荧光的净增量。

设计策略

探针和引物用随 ABI PRISM 7700 序列检测仪器一起的 PrimerExpress 软件（Applied Biosystems）设计，设计时可依据以下原则。

1. 两个等位基因探针的 T_m 值都在 67～70℃，两个探针 T_m 值的差别应该小于 1℃。
2. 探针必须被设计成退火时针对同一条链，即它们之间不能互补。
3. 探针的 5′端不能有 G，因为这种核苷会使报道基因染料结合到这一端而干扰荧光的产生。
4. 被用来设计探针的单链中 G 应少于 C，而且应尽量避免一次延伸≥3G。
5. SNP 大约位于探针的中间位置。
6. 虽然探针的长度由 T_m 值的要求决定，但应在 19～40nt。根据笔者的经验，越短的探针特异性越好，大于 35nt 的探针效果似乎不好。对于那些需要一定长度来满足 T_m 值需要的探针，应用改良探针代替，这种探针现已逐渐被 Applied Systems 所采用。
7. 探针的 5′端用 FAM 或 VIC 荧光报道染料合成，3′端用 TAMRA 淬火染料合成。
8. 引物的 T_m 值要比对应的探针 T_m 值小 7℃以上，3′端的引物尽可能地靠近探针但不能与探针重叠，整个扩增子的长度应小于 150nt。

基本方案　使用 TAQMAN 分析法的高通量基因分型

材料（标√的条目参见附录 1）

√15ng/μl 基因组 DNA 溶于 10mmol/L Tris · Cl，pH7.5（见配方）/0.2mmol/L EDTA（见配方）

PCR 混合液（表 2.5.1）

96 孔透明板和盖子（Applied Biosystems）

水平离心机

ABI PRISM 7700 测序系统（Applied Biosystems）

热循环仪

统计软件包（如 SPSS；http://www.spss.com）

表 2.5.1　用于 TaqMan 基因分型的 PCR 混合液

原液	一个反应体系/μl	终浓度
20μmol/L 引物	1.125	900nmol/L
20μmol/L 探针	0.125	100nmol/L
Master-mix[a]	12.5	
H_2O	9.25	
总体积	23	

a. Master-mix 包括 PCR 缓冲液、核酸、AmpliTaq Gold DNA 聚合酶、尿嘧啶-*N*-转葡糖基酶，可以从 Applied Biosystems 买到的参比染料——ROX。如果对来自不同孔板的所有样本集中进行基因分型，应当使用同一批 Master-mix，因为不同批次 Master-mix 的差异将导致最终荧光值重复的差异。

1. 96 孔透明板 B 到 H 行每孔加 2μl（30ng）基因组 DNA，保留 A 行作对照——其中 4 孔只加 2μl 缓冲液作为“无 DNA”对照，余下 8 孔每孔加 2μl 基因组 DNA 作为阳性对照，两种纯合子各加 4 孔。
2. 每孔加 23μl PCR 混合液，盖上透明盖，在水平离心机上短暂离心，用 ABI PRISM 7700 测序仪得到一个 PCR 反应前荧光读数。使用“Plate Read”形式，确保选中

Use Spectral Compensation for Endpoint 项（在 Advanced Options in the Instrument and Diagnostics 菜单下）。

3. 用下面的条件在热循环仪上开始 PCR。

1个循环：	2min	50℃
1个循环：	10min	95℃（变性）
40个循环：	15s	94℃（变性）
	1min	62℃（复性/延伸）
最终步骤：	无限	4℃（维持）

4. 再次读取荧光得到一个 PCR 反应后读数。如果使用 ABI PRISM 7700 提供的等位基因分析（allele-calling）软件，选用“Allelic Discrimination”模式读取荧光，通过算法可以自动分出基因型或通过视觉检查进行基因分型。

   如果进行大规模基因分型（如样本数>500），将多个孔板的样本数据集中起来确定基因型显得更为准确。这样，请遵照本方案中的剩余步骤。

5. 将原始数据（含 PCR 前和 PCR 后的）从孔板读数形式导入统计软件包。用如下方式计算标准化的荧光值：（报道荧光值－背景）/（参照荧光值－背景）；报道荧光在 FAM 和 VIC 道，参照荧光在 ROX 道。

6. 用一种非参数的测试（如 Kruskal-Wallis 测试）比较孔板之间每一种报道染料的平均 PCR 前标准荧光。如果一块孔板（或一组孔板）的 PCR 前荧光显著的不同于其他孔板，则相应的调整 PCR 后荧光值。例如，某一特定孔板的 FAM 报道染料的平均荧光是其他孔板的 1.5 倍，则该板每一孔的 PCR 后 FAM 荧光值除以该因数。

7. 使用逐步聚类分析（K-means clustering）自动将已校正的 PCR 后数据分成 4 组——3 个基因型和 1 个“无 DNA”对照。大多数统计软件包提供了可以直接使用的聚类分析算法。

   通常，聚类是明显的而无需进一步处理。为确定基因型分配是否有意义，检查数据的散点图很重要。例如，极端值会破坏聚类分析算法而产生明显错误的分类结果。去除这种极端值通常就有正确的分类结果。

参考文献：Landegren *et al.*，1998；Ranade *et al.*，2001

编者：Koustubh Ranade

单元 2.6 使用引物延伸荧光偏振探测法的高通量基因分型

本方案基于一种 DNA 测序反应，该反应测定紧邻测序引物（在方案中称为 SNP 引物）3′ 端的一个碱基的性质。SNP 引物设计成可以紧邻于待分型 DNA 的多态位点上游复性。当目的 DNA 和合适的经染料标记的终止分子（terminator）以及 DNA 聚合酶温育时，在多态位点出现的等位碱基的互补碱基使 SNP 引物延伸。通过检测组装的终止分子类别，就能推知目的 DNA 上出现的等位碱基（图 2.6.1）。

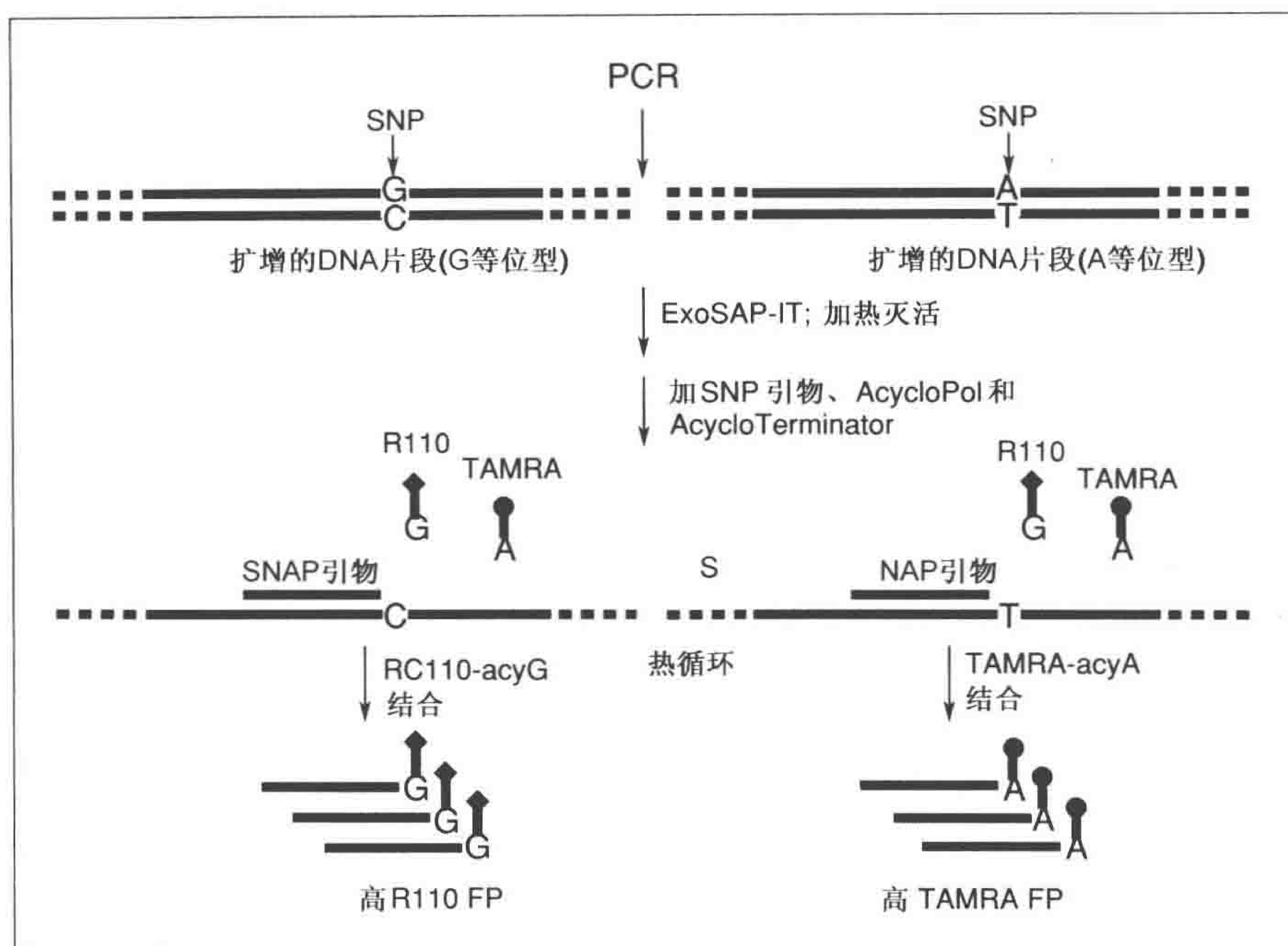


图 2.6.1　检测荧光偏振的引物延伸法。

设计策略

必须注意设计强效的 PCR 方案和避免 SNP 引物包含可能在 PCR 产物中出现的重复序列。为了实现高通量的基因分型，所有方案的 PCR 引物应当设计成相近的复性温度，以便使一组通用的反应条件适用于所有方案。SNP 引物也应当设计成相近（但更低）的复性温度。PCR 引物可以用 Primer3 程序（http://www. genome. wi. mit. edu/genome _ softwaren/other/primer3. html）选取并为强效扩增使用优化的参数。公共数据库的所有 SNP 均已通过本设计过程，针对这些 SNP 的 PCR 和 SNP 引物以及可行的设计方案可以在华盛顿大学（http://snp. wustl. edu）和 Perkin-Elmer 网站（http://las. perkinelmer. com/content/forms/SNPDatabase/welcome. asp）免费获得。

基本方案 1　单重 PCR 的引物延伸法

虽然单重 PCR 法比四重 PCR 法费用高（基本方案 2），但是它更灵活且易于优化。当需要获得某特定 SNP 的数据或某个 SNP 用多重法分析失败时，本方案是当然的选择。

材料（标√的条目参见附录 1）

0.8ng/μl 目的基因组 DNA

√10×PCR 缓冲液（可从 Invitrogen 购买）：200mmol/L Tris · Cl，pH8.4（见配方）/0.2mmol/L KCl

√2.5mmol/L 4dNTP 混合液

5U/μl Platinum *Taq* DNA 聚合酶（Invitrogen）

PCR 引物混合液：正向和反向引物各 0.2μmol/L（可由 Integrated DNA Technologies 合成）

AcycloPrime FP（Fluorescent Polarization，荧光偏振）SNP Detection Kit（Perkin-Elme）包含如下

Exo-SAP-IT kit

10× Exo-SAP-IT PCR 纯化剂

AcycloPol DNA 聚合酶

AcycloTerminator 混合液：6 种组合，每种含两个标记终止分子（R110-G/TAMRA-A、R110-G/TAMRA-C、R110-G/TAMRA-T、R110-C/TAMRA-A、R110-C/TAMRA-T、R110-A/TAMRA-T）加其他两种未标记的终止分子

10×反应缓冲液

1μmol/L SNP 引物：20～25 个碱基的目的 DNA 的正向和反向互补序列，该引物设计成能以 3′端紧邻多态位点复性（合成，如由 Integrated DNA Technologies）

384 孔黑色 PCR 板

多管移液器或液体操作工作站

384 孔 PCR 板封口垫

带加热盖的热循环仪

FP 读板设备：Victor^2 或 EnVision（Perkin-Elme）、LJL Analyst（Molecular Devices）或 Ultra（Tecan）

x-y 散点图绘制软件：如 Microsoft Excel 或 SNPScorer（Perkin-Elmer）

1. 用多管移液器或液体操作工作站为 384 孔 PCR 板每孔加 3μl 0.8ng/μl 的基因组 DNA。孔板于室温下用 benchtop 离心机以 500*g* 短暂离心，接着室温下空气干燥过夜。将孔板叠放并用塑料膜包裹保存于真空干燥器备用。
2. 每个孔板配制一份母液，包含：

   225μl 10× PCR 缓冲液；

   315μl 25mmol/L $MgCl_2$；

   90μl 2.5mmol/L 4dNTP 混合液；

   9μl 5U/μl Platinum *Taq* DNA 聚合酶；

   711μl H_2O。

   含干燥的基因组 DNA 的每孔加 3μl 母液。
3. 加 3μl PCR 引物混合液到 PCR 反应混合物。用封口垫封上孔板，室温下以 500*g* 短暂离心。
4. 用下面的热循环条件进行热启动 PCR。

1 个循环：	2min	95℃（变性）
35 个循环：	10s	92℃（变性）

40 个循环：　20s　　56℃（复性）
　　　　　　30s　　68℃（延伸）
1 个循环：　10min　68℃（最后延伸）
最终步骤：　无限　　4℃（维持）

5. 用 810μl 水稀释 90μl 10× Exo-SAP-IT PCR 纯化剂，加 2μl 这种 1×反应物到 PCR 产物混合液。用封口垫封上孔板，室温下以 500*g* 短暂离心。37℃温育 1h。80℃加热 15min 灭活酶。反应混合物降温至 4℃并维持至下一步骤。
6. 准备一份含下列试剂的母液：
   225μl 10×反应缓冲液；
   11.25μl AcycloPol DNA 聚合酶；
   225μl AcycloTerminator 混合液；
   1113.75μl H_2O。
   每份产物加 3μl 母液。
7. 每孔加 8μl 1μmol/L SNP 引物。用封口垫封上孔板，室温下以 500*g* 短暂离心。用下面的热循环条件进行引物延伸反应。

1 个循环：　2min　　95℃（变性）
20 个循环：　15s　　95℃（变性）
　　　　　　30s　　55℃（延伸）
最终步骤：　无限　　4℃（维持；避光）

8. 依照相应生产商的指示，使用 $Victor^2$、Analyst、Ultra 或 EnVision 等 FP 读板设备确定反应混合物的 FP 值。将两种染料的 FP 值导入电子制表软件（如 Microsoft Excel）或 SNPScorer，生成 *x*-*y* 散点图。根据每个样本在散点图中的位置指定基因型。

基本方案 2　四重 PCR 的引物延伸法

所有 PCR 引物应当设计为使用同样的参数，这样可在相同的条件下工作。四重 PCR 方案最适于多标记分型的大规模项目。

材料（标√的条目参见附录 1）

　0.8ng/μl 目的基因组 DNA
√10× PCR 缓冲液（可从 Invitrogen 购买）：200mmol/L Tris · Cl，pH8.4（见配方）/500mmol/L KCl
√2.5mmol/L 4dNTP 混合液
　5U/μl Platinum *Taq* DNA 聚合酶（Invitrogen）
　PCR 引物混合液：针对组合中 4 种 SNP 的 8 条 PCR 引物各 0.22μmol/L（可由 Integrated DNA Technologies 合成）
　AcycloPrime FP SNP Detection Kit（Perkin-Elme）包含如下组分：
　　Exo-SAP-IT kit
　　10× Exo-SAP-IT PCR 纯化剂
　　AcycloPol DNA 聚合酶

AcycloTerminator 混合液：6 种组合，每种含两个标记终止分子（R110-G/TAMRA-A、R110-G/TAMRA-C、R110-G/TAMRA-T、R110-C/TAMRA-A、R110-C/TAMRA-T、R110-A/TAMRA-T）加其他两种未标记的终止分子

10×反应缓冲液

0.2μmol/L SNP 引物：20～25 个碱基的目的 DNA 的正向和反向互补序列，该引物设计成能以 3′端紧邻多态位点复性（合成，如由 Integrated DNA Technologies）

384 孔透明 PCR 板和黑色 PCR 板

多管移液器或液体操作工作站

384 孔 PCR 板封口垫

带加热盖的热循环仪

FP 读板设备：Victor[2] 或 EnVision（Perkin-Elme）；LJL Analyst（Molecular Devices）或 Ultra（Tecan）

x-y 散点图绘制软件：如 Microsoft Excel 或 SNPScorer（Perkin-Elmer）

1. 用多管移液器或液体操作工作站为 384 孔透明 PCR 板每孔加 8μl 0.8ng/μl 的基因组 DNA。孔板于室温下用 benchtop 离心机以 500*g* 短暂离心，接着室温下空气干燥过夜。将孔板叠放并用塑料膜包裹保存于真空干燥器备用。
2. 每个 384 孔板配制一份母液，包含：
   450μl 10× PCR 缓冲液；
   630μl 25mmol/L $MgCl_2$；
   180μl 2.5mmol/L 4dNTP 混合液；
   18μl 5U/μl Platinum *Taq* DNA 聚合酶；
   522μl H_2O。
   含干燥的基因组 DNA 的每孔加 4μl 母液。
3. 加 7μl PCR 引物混合液到 PCR 反应混合物。用封口垫封上孔板，室温下以 500*g* 短暂离心。
4. 用下面的热循环条件进行热启动 PCR。

1 个循环：	2min	95℃（变性）
35 个循环：	10s	92℃（变性）
40 个循环：	20s	58℃（复性）
	30s	68℃（延伸）
1 个循环：	10min	68℃（最后延伸）
最终步骤：	无限	4℃（维持）

5. 用 1800μl 水稀释 200μl 10×Exo-SAP-IT PCR 纯化剂，加 5μl 这种 1×反应物到 PCR 产物混合液。用封口垫封上孔板，室温下以 500*g* 短暂离心。37℃温育 1h。80℃加热 15min 灭活酶。反应混合物降温至 4℃并维持至下一步骤。
6. 在一个 384 孔黑色 PCR 板中每孔加 10μl 0.2μmol/L SNP 引物。将 3μl 处理过的 PCR 产物（来自第 5 步）移入孔板上的各孔。

7. 准备一份含下列试剂的母液：
   900μl 10×反应缓冲液；
   11. 25μl AcycloPol DNA 聚合酶；
   76. 5μl AcycloTerminator 混合液；
   2162. 25μl H_2O。
   每孔加 7μl 到第 6 步准备的孔板。用封口垫封上孔板，室温下以 500*g* 短暂离心。
8. 用下面的热循环条件进行引物延伸反应。

1 个循环：	2min	95℃（变性）
20 个循环：	15s	95℃（变性）
	30s	55℃（延伸）
最终步骤：	无限	4℃（维持；避光）

9. 依照相应生产商的指示，使用 Victor^2、Analyst、Ultra 或 EnVision 等 FP 读板设备确定反应混合物的 FP 值。将两种染料的 FP 值导入电子制表软件（如 Microsoft Excel）或 SNPScorer，生成 x-y 散点图。根据每个样本在散点图中的位置指定基因型。

参考文献：Chen *et al.*，1999；Hsu and Kwok，2003；Hsu *et al.*，2001；Kwok，2002

编者：Pui-Yan Kwok

第 3 章 体细胞杂交简介

自从 25 年前，利用体细胞杂交技术定位了胸腺嘧啶基因以来，这一技术已成为基因定位研究的强有力的工具。如同分子遗传学其他技术都要经历一个逐渐演变的过程一样，体细胞杂交这一方法学从它出现后也经历了这样一个演变过程。在今天，由于与人类基因组计划的重要组成部分——基因组绘图息息相关，毫无疑问，体细胞杂交将继续扮演着人类遗传学分析基本工具的角色。

随着分子遗传学技术出现，体细胞杂交也取得了重要的进步：作为探针的 DNA 可以从用于体细胞杂交或 Southern blot 的细胞中获取，而来自相应基因的探针无论是杂交到滤膜，还是杂交到染色体的变性或非变性的片段上，都能被辨别。然而，由于人类与啮齿目动物在 DNA 和蛋白质水平上的相似性，作为杂交用的片段必须非常特异，以免与啮齿目动物发生交叉反应。利用这一技术，许多基因被成功定位，但值得注意的是：由于假基因和基因家族的存在，探针在设计时应尽量与该基因的相应片段吻合，以免与这些基因发生交叉反应。

分子生物学的其他技术的发展也推动了体细胞杂交技术的进步。聚合酶链反应（PCR）的出现，导致了一个新的筛选探针池的方法，使用于杂交的 DNA 量大大减少。用于聚合酶链反应中的杂交片段常采用人类特异的重复片段（如 Alu 序列）作为引物，这样，虽然仅与少量的染色体片段发生了杂交反应，但通过聚合酶链反应也可以显示这种杂交信号。但在刚采用杂交技术进行基因定位时，通过常规的细胞遗传手段分析，往往不能正确辨别那些与残存在细胞中的染色体发生杂交反应的信号，致使出现假阳性或假阴性的错误分析结果。那些来源于断裂的染色体片段在杂交时可能与人类具有同源性的啮齿目动物的相应片段发生匹配，用整条染色体或 $C0t_1$ DNA 或全基因组 DNA 作为探针，以保证探针的特异性，这在以前是根本不可能的事。

这一章节主要讲述通过用黏附受体细胞，用黏附或悬浮细胞作为供体细胞进行全细胞融合来产生体细胞杂交的最基本的方法，产生体细胞杂交常用的选择性的标记基因，以及对最后融合细胞系进行分析的三种常用方法。

编者：Cynthia C. Morton

单元 3.1 体细胞杂交的构建

注意：所有的孵育实验都是在潮湿，37℃，5% CO_2 的孵育器中进行，培养基必须预热，否则不予使用。

用于哺乳动物细胞可选择的标记

采用含有营养缺陷型、温度敏感型或其他突变基因的细胞系作为受体细胞（表

3.1.1)，供体细胞的染色体上含有与受体细胞染色体上作为选择用基因互补的基因。如果这些内源性的选择标记基因不能被利用，则可以将来自于细菌的选择标记基因引入供体细胞，供体细胞的选择根据体细胞杂交最后的用途而定。常用的细胞类型包括原代成纤维细胞、类淋巴细胞和淋巴细胞。供体细胞一般不要求确定哪条染色体携带标记基因，但对于个别研究，可能需要明确这一点（Athwal *et al.*，1985；Warburton *et al.*，1990；Kurdi-Haidar *et al.*，1993)。

当供体细胞与受体细胞融合后，马上加入选择药物，只有那些与携带标记基因染色体的供体细胞发生融合的细胞才能生存下来。获得单条染色体杂交最好的方法是使你感兴趣的染色体带上标记基因。对供体细胞来说，这一类型的选择常被认为是一种正选择方式，而对某些染色体，可以使之与啮齿目动物的某个突变基因互补从而达到选择的目的，而与啮齿目动物的突变基因对应的人类染色体上的基因通常已明确其基因功能。例如，HAT 培养基常被用于培养以 $HPRT^-$ 为受体细胞的含有人类 X 染色体的杂交细胞的选择，因为它可以阻断 DNA 的正常途径的合成，而迫使细胞通过依赖 HPRT 的补偿途径来合成 DNA，而这个 HPRT 基因位于人类的 X 染色体上。这样，只有那些含有 X 染色体的杂交细胞才能存活，达到选择的目的，在一些实验体系，常把这种选择方式称为负选择，这种负选择效应可以在 X 染色体上含有 $HPRT^+$ 细胞系的培养基中加入 6-硫代鸟嘌呤来消除。下面描述杂交细胞中常被用作选择标记的基因及特性。

哇巴因

哇巴因是 Na^+/K^+ ATPase 的抑制剂。啮齿动物细胞可以在一定浓度哇巴因中生长，但人类细胞在该浓度下却不能存活，因此，通过哇巴因的选择可以有效地分离那些未杂交上的人类供体细胞。哇巴因在培养基中的浓度维持在 1～2μmol/L，即可达到选择的目的。

胸腺嘧啶核苷激酶（TK）

TK 是来自胸腺嘧啶的 dTTP 的合成的一个补偿性酶。大多数的哺乳动物的细胞系表达 TK 基因，因此，这一个标记需要特异的 TK^- 细胞系作为受体细胞。为了达到正选择的目的，在完全的培养基加入 100μmol/L 次黄嘌呤、0.4μmol/L 氨基蝶呤、16μmol/L 胸腺嘧啶和 3μmol/L 甘氨酸（HAT 培养基)，这种培养基可以阻断从 dCDP 到 dTDP 的合成，迫使细胞利用 TK 补偿途径，强迫细胞使用 TK 路径。对于负选择（即从 TK^+ 到 TK^-），在完全的培养基加入 30μg/ml 的 5-溴脱氧尿苷（BrdU)，即可杀死 TK^+ 细胞。

次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶（HPRT）

HPRT 是催化次黄嘌呤向次黄嘌呤核苷酸（IMP）转化，（IMP）再转变成 dGTP 或 dATP 过程中的补偿性酶。在正选择（从 $HPRT^-$ 到 $HPRT^+$）中完全培养基加入 100μmol/L 次黄嘌呤、0.4μmol/L 氨基蝶呤、16μmol/L 胸腺嘧啶和 3μmol/L 甘氨酸（HAT 培养基)。氨基蝶呤抑制新生嘌呤的合成。当细胞不再使用 HAT 培养基，它们应该被转移到含有次黄嘌呤和鸟嘌呤的非选择的培养基中。对于负选择（从 $HPRT^+$ 到

$HPRT^-$），用于杂交细胞选择的完全培养基中应加入40μg/ml的5-溴脱氧尿苷（BrdU）。

腺嘌呤磷酸核糖转移酶（APRT）

APRT是一种以腺嘌呤和5-磷酸核糖-1-焦磷酸盐为底物，催化腺嘌呤转化为AMP的补救酶，在正选择（从$APRT^-$到$APRT^+$）完全培养基中加入100μmol/L的腺嘌呤，0.8μmol/L的氨基蝶呤和16μmol/L胸腺嘧啶核苷（AAT培养基），对于负选择（从$APRT^+$到$APRT^-$），在用作选择用的完全培养基中加入30μg/ml的2，6-二氨基蝶呤。

黄嘌呤-鸟嘌呤-磷酸核糖转移酶（XGPRT，gpt）

XGPRT是一种与哺乳动物不同源的细菌酶，这使它可以作为在哺乳动物细胞系具有优势的一种选择的标记物。使用时，完全培养基中加入透析的FBS、250μg/ml的黄嘌呤、15μg/ml的次黄嘌呤、10μg/ml的脱氧胸腺嘧啶核苷、2μg/ml的氨基蝶呤、25μg/ml的霉酚酸、150μg/ml的左旋谷氨酰胺。氨基蝶呤和霉酚酸可以抑制新的GMP的合成。选择含黄嘌呤而非鸟嘌呤的培养基，霉酚酸的量可以根据细胞系的不同而加以变化，与培养基中是否存在鸟嘌呤无关。

氨基糖苷磷酸核糖转移酶（neo、G418、APH）

哺乳动物细胞系表达细菌APH基因可以消除G418的毒性作用。使用时，将G418用缓冲液配制（如用100mmol/L HEPES，pH7.3）成较高浓度的储存液，用于选择的完全培养基中G418浓度为100～800μg/ml。注意：在致死剂量的G418筛选浓度下，细胞可分裂一或两次，所以筛选药物在几天内起效就显而易见了，G418是最多被用于正选择体系的基因。

潮霉素-B磷酸转移酶（HPH）

HPH基因（从*E.coli*质粒pJR225分离；Gritz and Davies，1983）去潮霉素-B，磷酸化的蛋白质合成抑制剂。为了用于选择，补充含10～400μg/ml潮霉素-B的完全培养基（许多细胞系需要200μg/ml）。注意，有效表达HPH基因的载体不如表达G418耐药性的载体广泛。在需要使用两个不同的选择性标记时常用到这个标记。

组胺醇脱氢酶（hisD）

在无组氨酸但含组氨醇的培养基中，只有具有组胺醇脱氢酶（hisD）基因的细胞才能生长，哺乳动物细胞不能合成组氨酸。但组胺醇脱氢酶（hisD）能把组氨醇氧化为组氨酸。因为组氨醇也是组氨酰-tRNA合成酶的有效抑制因子。当培养基中有组氨酸时，细胞也可能利用这种途径，当组氨醇的浓度足够高时。选择含组氨酸和4～5mmol/L组氨醇（Sigma）的完全培养基或无组氨酸但含≤5mmol/L组氨醇的培养基。注意，在含组氨酸的培养基中，组氨醇会妨碍大多数的受体细胞系但不是所有的受体细胞系的生长，因此，在有融合倾向之前，要检测受体细胞系。

基本方案 单层全细胞融合

本方案描述 PEG 诱导的两种细胞的融合。

材料

汇合至一定程度的受体细胞（表 3.1.1）

受体细胞适合生存的培养基，加或不加血清（附录 3I），37℃

合适的选择性试剂（见哺乳动物细胞适合的选择性标记）

含感兴趣染色体及合适遗传标记的供体细胞

✓50%（*m*/*V*）PEG 1000，37℃

10cm 组织培养板

25cm 组织培养瓶

倒置相差显微镜

表 3.1.1 在融合中常用的受体细胞系

细胞系	类型	标记[a]	来源
A9	鼠（L 细胞）	$HPRT^-$，$APRT^-$	ATCC＃CCL 1.4
L-M TK^-	鼠（L 细胞）	TK^-	ATCC＃CCL 1.3
RAG	鼠	$HPRT^-$	ATCC＃CCL 142
E36	仓鼠	$HPRT^-$	Gillin et al.，1972
CHOK1	中国仓鼠卵巢[b]	PRO^-	ATCC＃CCL 61

a. 标记的描述，包含选择条件和参考文献，在这章中能找到缩写：HPRT，次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶；APRT，腺嘌呤磷酸核糖转移酶；TK，胸腺嘧啶激酶；Pro，脯氨酸。

b. 适合于研究者的很多营养缺陷型和其他中国仓鼠卵巢来源的突变来源及其他中国仓鼠细胞系。

1. 倘若不知道细胞的选择条件，通过以下方式来确定：将培养于 25cm 培养瓶中的受体细胞传代，比例为 10∶1，分装于不同培养瓶中，并用不同水平的选择试剂来培养。每周 2 次观察细胞，换液，10d 之后确定抑制细胞生长的试剂的最低浓度。
2. 在融合前的当天下午，将等量的供体细胞和受体细胞（通常为 $5\times10^5\sim1\times10^6$ 个）培养于含 10ml 有血清的培养基中，同时分别将供体细胞和受体细胞培养于含或不含 PEG 的培养基来做对照，培养过夜。

   供体和受体细胞在选择条件下需死亡，含 PEG 的细胞应该在选择条件下恢复并开始汇合，当一个新细胞系或新的 PEG 使用时，后者的对照需重做。
3. 在显微镜下观察细胞，其需 70%汇合，细胞与细胞之间需接触良好，但互不挤压，若细胞量不够，准备新培养瓶增加培养。
4. 将瓶中的培养基吸出，用无血清的培基洗 2 次，并完全将其吸出，将瓶倾斜一段时间同时将最后的培养基吸出。
5. 加 2ml 50%PEG 溶液，37℃。将培养瓶来回倾斜使溶液在细胞中快速混匀，让其站立 2min（时间非常重要），若有必要，通过以下试验来优化条件：PEG 浓度为 44%～50%；单层细胞孵育 2～3min，悬浮细胞 2～4min。
6. 将 10ml 无血清培基轻柔地从皿的一边加入，轻柔颠倒使 PEG 扩散完全，吸出培养

基并弃去，用无血清培养基重复洗两次，最后一次用 10ml 有血清培养基洗，由于细胞膜此时非常脆弱，故以上操作均需轻柔。

7. 加入 10ml 有血清培养基，孵育 36～48h（在该时间段内使细胞扩增 2 次）。
8. 用胰酶消化细胞，将其分至 5～10 个 10cm 培养板中。为了确保选择，板中的细胞浓度需低，以保证细胞在汇合之前能分裂几次。在每个板中加入 10ml 有血清培养基和合适浓度的选择性试剂（第 1 步），在 37℃中孵育。
9. 每 5d 换一次液直至长出克隆，换了选择性培基后 10～14d 后确认皿中是否有克隆长出。避免损坏细胞或使其长得越来越大，因为移动细胞可能使其长出姐妹克隆。
10. 用挑克隆的针将克隆挑出（支持方案 1）。
11. 为了避免维持和扩增不需要的细胞系，一旦克隆长出，立即扩增、鉴定（第 3～5 步）及冻存（附录 3I）。为避免染色体缺失和重组，传代需少（三代以内细胞使用一个冻存管，1 个 6cm 培养皿使用 2 个冻存管）。在鉴定细胞系时，需使用多种鉴定方法，在复苏和扩增时需重新鉴定以确保无染色体重组和分离。若有必要，对已分离出额外染色体的细胞系挑亚克隆（支持方案 2）
12. 在快速复苏时，将细胞培养至 25cm 组织培养瓶中，若细胞在冻存后恢复较慢，则增加冻存培养基中的血清含量。

备选方案　悬浮培养供体细胞-单层的供体细胞的全细胞融合

该步骤用于供体细胞系来源于悬浮培养或悬浮的淋巴细胞。

附加材料（见基本方案）

供体细胞生长于悬液或来源于新鲜全血的淋巴细胞

15ml 扣盖的聚丙烯试管

1. 消化贴壁生长的受体细胞，在培基中重悬，用血细胞计数器对供体细胞和受体细胞计数，分别取 2×10^6 个，在 15ml 扣盖的聚丙烯试管中混匀，维持以确保选择有效。
2. 室温 400g 离心 5min，在受体细胞中加入 10ml 无血清的培基，再次离心，小心吸出培养基，将试管倾斜以吸干培养基。
3. 轻弹试管使团块松散。用移液器吸取 0.3ml 50% PEG 溶液，37℃，沿管壁加入同时轻摇或轻弹试混匀。室温孵育 3min。如有必要，可以优化融合条件（基本方案，第 5 步）
4. 加入 8ml 无血清培养基，立即 400g 离心 5min。
5. 小心吸出培养基，再用 10ml 无血清培养基重悬细胞。再次离心。室温下，吸出培养基，用 10ml 血清培养基重悬细胞。洗的过程中要格外小心，因为此时细胞的膜很脆弱。
6. 加 3ml 细胞悬液到每个 100mm 组织培养板内。加 1ml 细胞悬液到另一 100mm 培养板内，作为对照。孵育 36～48h。
7. 用加血清和筛选因子的培养基培养细胞（用未加筛选因子作对照）。
8. 准备克隆及其鉴定（基本方案，第 9～12 步）

支持方案1　用克隆柱分离克隆

附加材料

培养在培养板的细胞
√PBS，37℃
真空灭菌的润滑脂（装在经高压灭菌的玻璃皿内），5%（*m/V*）胰酶/2%（*m/V*）EDTA，37℃（分装保存于−20℃）
√克隆柱
6孔或24孔培养板

1. 从培养板外面观察细胞，用标记笔圈出克隆。
2. 在倒置显微镜下观察克隆，并选择100～150个细胞大小并易与其他克隆分离的健康克隆。从不同孔板上挑取克隆。避免混淆同来源的克隆，根据融合、接种、细胞来源不同对克隆进行标记。
3. 去除培养基，用5ml 37℃PBS洗细胞。
4. 用克隆柱的一端短促浸入装有真空灭菌的润滑脂的玻璃皿内，使克隆柱一端有一层润滑脂，这样克隆柱接触培养板时不会对克隆造成污染。用灭菌的钳状骨针使克隆柱盖在被选上的克隆上，可以利用培养板的标记进行。
5. 用钳状骨针使克隆柱保持不动，用灭菌的带塞的巴氏移液器加入2或3滴37℃ 5%胰酶/2% EDTA。37℃，孵育5min。如果克隆柱漏液，在上端把钳状骨针的一边往下推，并加入更多的胰酶/EDTA。
6. 在倒置显微镜下观察培养板，看克隆是否完全被消化（如细胞变圆，有些浮着）。
7. 用灭菌的巴氏移液器上下轻轻吹打几次使细胞分散。
8. 快速转移生长系（如A9）到6孔板中。较慢的转移生长系（如一些CHO衍生物）到24孔板并从那里扩增。保持传代操作，在约5代时，从单克隆接种细胞到高混合的100mm板中，准备大量DNA抽提。

支持方案2　亚克隆杂种细胞群

用这一方法，杂种细胞能够被再克隆成额外染色体已被分离的单独的细胞系。

材料

被克隆的杂种细胞（基本方案或备选方案）
适合杂种细胞系的含血清培养基（附录3I）
96孔板

1. 计数被克隆的杂种细胞（附录3I）并用含血清培养基稀释到5个细胞/ml。剧烈的吸打制成细胞悬液。
2. 按照每孔0.2ml转移被稀释的细胞到一个96孔板（平均每个孔1个细胞）。孵育，并按照每周2次更换培养基，直到在灯光下出现克隆。
3. 弃去包含一个以上克隆的孔。按照需要扩增包含单克隆的孔。

支持方案 3　细胞遗传学：分裂中期染色体的 G-11 染色

细胞遗传学提供了最直接的鉴定感兴趣的染色体的方法。有关染色体制备、染色的细胞遗传学方法的分类，在单元 4.1 和单元 4.3 中描述。G-11 是一种可替代这些技术的不同的染色方法。这个步骤（H. F. L. Mark 提供）对于区别人类染色体（染成蓝色并具有红色的 paracentromeric 区）和啮齿类染色体（染成紫红色并具有蓝色着丝粒）相对简单。这种方法以及在单元 4.1 和单元 4.3 描述的染色显带方法都不能鉴别人类染色体的小片段。

材料

人-啮齿类杂种细胞系细胞（基本方案或备选方案）
被用来构建杂种细胞的人供体和啮齿类受体细胞系
✓吉姆萨染色
氨丁磺酰胺缓冲液：氨丁磺酰胺缓冲液胶囊剂，pH11.0（Micro Essential 试验室），溶于 100ml 水。
染色缸
60℃水浴箱
100ml 染色盘
在显微镜下用 10×物镜搜索视野，然后在 100×油镜下分析

注意： 整个操作步骤中用的水都必须是双蒸水。

1. 准备人-啮齿动物杂交细胞在分裂中期的玻片上以便鉴定，这种杂种细胞来自人供体和啮齿动物受体细胞系（单元 4.1）。优化染色体密度以得到清晰的人与啮齿动物染色体的颜色差别而不影响带的质量，而条带的质量是与密度相反的性质。
2. 把玻片置于玻片染色缸内，水覆盖，60℃ 预浸 1～3h。
3. 准备染色液，往玻片染色缸里加入 5ml 吉姆萨染液和 95ml 氨丁磺酰胺缓冲液。在 100ml 染色盘中 37℃ 预热。如果颜色变化太快，吉姆萨染液的量减少到 2%（2ml 吉姆萨染液于 98ml 氨丁磺酰胺缓冲液中）。
4. 每一批细胞放 8 张风干的分裂中期的玻片于染色液中。第一张玻片在 5min 后取出，接着每隔 5min 取出一张，总共用 40min。取出后立即放入玻片染色缸中用水冲洗，风干。
5. 显微镜亮视野下观察玻片。

支持方案 4　原位杂交

原位杂交（单元 4.4）只需少量的细胞，可以检测到常规细胞遗传学上不明显的人染色体的细小的断裂片段，且不需要丰富的细胞遗传学经验。一般通过生物素或地高辛标记，整个人基因组 DNA 能够杂交到杂种细胞系的中期染色体上。通过酶检测或荧光检测可以检测到人全部的染色体及染色体片段。商业化染色体特异性标记探针可用于鉴定不同的人染色体，也可用于确定杂种细胞系中不同的染色体成分。这需要大量的分裂中期相，但与分别检测单独的探针相比，同时快速检测带有不同荧光素的多种标记探针可以节约不少的时间和材料。

表 3.1.2 细胞杂交的PCR引物[a]

基因符号	染色体区域	PCR引物	引物序列	产物大小[b]/bp	条件[c]/[℃/mmol/L]	基因区域[b,d]
NGFB	1p22.1	NGFB1 NGFB2	5′-GATGCCAGATTAGGGATCTGCTGG-3′ 5′-ACTCCTGCTTCTGGCAGCTGCAG-3′	497	65/1.5	A
REN	1q32或q42	REN1 REN2	5′-CCTGCCAAGAAACCAGTCATGAAG-3′ 5′-ATCTTGTGTCCAGTGACGCTAGCA-3′	285	60/1.5	B
POMC	2p23	POMC1 POMC2	5′-GACCCAAGAGTCTCTTGACTTGAG-3′ 5′-CTCTGCACTAAGCCTCCAAAACTG-3′	593	60/1.5	B
TGFA	2p13	TGFA1 TGFA2	5′-GATCTGAGCCCTGCATCTTTCCT-3′ 5′-GATCTCCAGGAGAACAGGGGATAC-3′	180	60/1.5	A
IL1A	2q12-q21	IL1A1 IL1A2	5′-AACTTAGCCACTGGTTCTGGCTGA-3′ 5′-GAATCTTGGCAGCTCCTGGCAACT-3′	396	60/1.5	C
ALPP	2q37	ALPP1 ALPP2	5′-GACCATGGTCATCATGAAAGCAGG-3′ 5′-GTGCCAGCATTACTCCCATTTGAC-3′	279	60/1.5	A/B
GLB1	3p21-pter	GLB1 GLB2	5′-TGATGAAAGCCTGTGCTTTGAG-3′ 5′-AAAGCTTCCATTCCAGCCCTG-3′	245	60/2.0	D
GLUT2	3q26	GLUT2A GLUT2B	5′-AAACAATAAGGGAACCGTCTGT-3′ 5′-CTCTATAATCCATTCCACATGAA-3′	550	58/2.5	D
QDPR	4p15.3	QDPR1 QDPR2	5′-GTCACTAACCTGTCTCAGTGTGG-3′ 5′-GTAGTCAAGATGACAGCCACTGTC-3′	297	65/1.5	D
AFP	4q11-q13	AFP1 AFP2	5′-GATGCACCTGACCCACTTTATAAAG-3′ 5′-GAGATTGTCTGACCGATTCAGACTC-3′	321	60/1.5	C
C9	5p14-p12	C9A C9B	5′-AGCTGTTGGCTTCTCTGAGCTCCA-3′ 5′-TTTCCGTGGATAAGCAGTTCTGGC-3′	309	60/1.5	D
HMGCR	5q13.3-q14	HMGCR1 HMGCR2	5′-GCCCGACAGTTCTGAACTGGAACA-3′ 5′-GAACCTGAGACCTCTCTGAAAGAG-3′	160	65/1.5	D

续表

基因符号	染色体区域	PCR引物	引物序列	产物大小[b]/bp	条件[c]/[℃/mmol/L]	基因区域[b,d]
TNFA	6p21.3	TNFA1 TNFA2	5′-CAGGGTCCTACACACAAATCAGTCA-3′ 5′-AAGAGAACCTGCCTGGCAGCTTGT-3′	417	65/1.5	C
MAS1	6q24-q27	MAS1 MAS2	5′-CGGTCACAGTTGAGACTGTCGTCT-3′ 5′-TTAGTATCTCATGCATATGGGATGAG-3′	157	60/1.5	D
EGFR	7p13-p12	EGFR1 EGFR2	5′-CCAGTCATGAGCGTTAGACTGACT-3′ 5′-TAGATGACTCAAGGCAGAGACACT-3′	495	60/1.5	D
CFTR	7q31-q32	C16B C16D	5′-GTTTTCCTGGATTATGCCTGGCAC-3′ 5′-GTTGGCATGCTTTGATGACGCTTC-3′	97	60/2.0	B
NEFL	8p21	NEFL1 NEFL2	5′-GCTCCAGGACCTCAATGACCGCTT-3′ 5′-AAAGGTCGGGCTTGGTCACGTCCA-3′	490	65/1.5	B
DEF	8p23-p22	DEF3A DEF3B	5′-CTTGCAGAAAAAGAAAAATGAGCTC-3′ 5′-′GTAACAAGGCATTTATTTGAGATGAG-3′	NR	60/1.5	NR
LHRH	8p21-11.1	LHRH1 LHRH2	5′-GGGCCAGAAGGAATGACCATTAC-3′ 5′-CATTCACAACACAGCACTTTATTATGG-3′	NR	60/2.0	NR
TG	8q24	TG1 TG2	5′-GAGCCTGTTCCCTCCAAAGATACA-3′ 5′-CTTACCGAAGATATTGGCCGACAC-3′	392	65/1.5	C
RLN1	9pter-q12	RLN1A RLN1B	5′-CAGAGCTACAGCAGTATGTACCTG-3′ 5′-TCAAACAGTGCCACGTAGGGTCGT-3′	178	60/1.5	B
IFNA	9p22-p13	IFNA1 IFNA2	5′-CTCATTGACTAATGCATCATCTCACAC-3′ 5′-TCAGGTTATACTGTCAGGCTTGGCAT-3′	348	65/1.5	D
ALDOB	9q21.3-q22.2	ALDOB1 ALDOB2	5′-AGCCTAGCTCCAGTGCTTCTAGTA-3′ 5′-CTTTGGATGAGGAGCCGATATTG-3′	189	65/1.5	D
FNBR	10p11.2	FNBR1 FNBR2	5′-CTGAAAGACAAGTATGTTGAGAGTTGC-3′ 5′-GAATGTGACTAGTGTGAAACAAGATGGG-3′	581	65/1.5	D
PLAU	10q24-qter	PLAU1 PLAU2	5′-ATCTGATGCTCTTCAGCTGGGCCT-3′ 5′-CTGGAGGACAAACAGAGGGATGTCTT-3′	289	65/1.5	A/B
CAT	11p13	CAT1 CAT2	5′-ATATCACGTTGCTGCCCATGAGGT-3′ 5′-GCATTTGCACATCTAGCACAGGA-3′	219	65/1.5	A/B
CLG	11q21 q22	CLG1 CLG2	5′-AGTACAGGAGCCGAACAGCCATC-3′ 5′-GGTGACTCCTAGCAGATTATTTGG-3′	302	65/2.0	C

续表

基因符号	染色体区域	PCR引物	引物序列	产物大小[b]/bp	条件[c]/[℃/mmol/L]	基因区域[b,d]
KRAS2	12P12.1	KRAS1 KRAS2	5′-GATTCCTACAGGAAGCAAGTAGTAA-3′ 5′-CTATAATGGTGAATATCTTCAAATGATTT-3′	179	65/3.0	B
F8VWF	12pter-p12	F8VWF1 F8VWF2	5′-GACACTAACGGAGGATACCGCTGAG-3′ 5′-CACAAAGTCTTCTCACACAGGGCC-3′	NR	60/1.5	NR
PAH	12q22-q24.2	PAH1 PAH2	5′-GGACCTGCTTCATTCAAGCTTCATA-3′ 5′-GGATTAGGTGCAGAGTTTTATTACCT-3′	334	65/2.0	D
RB1	13q14.2	RB1 RB2	5′-GAGGAAACAATCTGCTACAACT-3′ 5′-CCAGCTTCTACTCGAACA-3′	334	50/1.5	A/B
NP	14q11.2	NP1 NP2	5′-AGCAGAGCGAGTAACTCACAGTAG-3′ 5′-GCTACACTGAAATGCATGACATACAT-3′	344	65/1.5	A
PI	14q32.1	PI1 PI2	5′-GAAGCTCTCCAAGGCCGTGCATAA-3′ 5′-GTTGAGGAGCGAGAGGCAGTTATT-3′	222	65/1.5	B
B2M	15q21 q22.2	B2M1 B2M2	5′-CACCCAGTCTAGTGCATGCCTTCT-3′ 5′-TGAGAAGGAAGTCACGGAGCGAGA-3′	357	65/1.5	A
HBA	16p13.3	HBA1 HBA2	5′-ATCAACTGTCAGGAAGACGGTGTC-3′ 5′-TACAGGCATGAGTCATCACACCTG-3′	350	65/1.5	D
HPR	16q22.1	HPR1 HPR2	5′-CTGACCATCTGAAGTATGTCATGCT-3′ 5′-GCATCGCCATAGCAGGTGTCTTC-3′	186	65/1.5	B
LCAT	16q22.1	LCAT1 LCAT2	5′-TCATTGAGTAAGCTGACACTGAGCA-3′ 5′-TTCAGCTTGATGCTGGACATGATG-3′	222	65/1.5	A/B
TP53	17p13.1	TP53A TP53B	5′-TTCCTCTTCCTGCAGTACTC-3′ 5′-AGACCTCAGGCGGCTCATAG-3′	397	55/1.5	A/B
MPO	17q21-q23	MPO1 MPO2	5′-CACTTCCTGCATTGAACCTGGCTT-3′ 5′-CTCAAGGTCACATAGCTAGCAAGC-3′	417	65/1.5	B

续表

基因符号	染色体区域	PCR引物	引物序列	产物大小[b]/bp	条件[c]/[℃/mmol/L]	基因区域[b,d]
GAS	17q	GAS1 GAS2	5′-ATGCTAGTCGGTGTAGAGCCATG-3′ 5′-TTGTACCTCATAGGGCTGCGTGA-3′	297	65/1.5	C
TS	18pter-q13或q21.3-qter	TS1 TS2	5′-TTGCCACTGGCAAATGTAACTGTGC-3′ 5′-ACACTCTACATCATGATCGATGGTG-3′	289	65/2.0	D
LDLR	19p13.2-p13.1	LDLR1 LDLR2	5′-AGCTGGATCACTTGAGTTCAGGAGT-3′ 5′-CTATCTGTACAGGGACGCATTTACG-3′	497	65/1.5	D
APOC2	19q13.2	APOC2A APOC2B	5′-AGGGCAAAGATCGATAAAGCAGGAAT-3′ 5′-CCACCCTAACTCTAAGCAGAAGCT-3′	297	65/1.5	A
PRIP	20pter-p12	PRIP1 PRIP2	5′-GRCACAACACTGAACCTCTGGCTA-3′ 5′-CTATGAACTTGACCTAATTCTGGT-3′	412	65/3.0	D
ADA	20q13.11或20q13.2-qter	ADA1 ADA2	5′-GTAAGAAGTACCAGCAGCAGACCG-3′ 5′-GGATTCCAGTTCCAAGCCTTAAGA-3′	251	65/1.5	A
APP	21q21.2	APP1 APP2	5′-GCTGTATCAAACTAGTGCATGAATAG-3′ 5′-GCAGAAGCAATCTGTACAGTAA-3′	295	65/1.5	D
CD18	21q22.3	CD18A CD18B	5′-CACAGCTCTTGAGGATGTCACCAA-3′ 5′-TCAGACTGATGTCCTGACTTGCAC-3′	208	65/1.5	D
IGLC2	22q11.1-q11.2	IGL1 IGL2	5′-CTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGG-3′ 5′-TTCATGCGTGACCTGGCAGCTGTA-3′	229	65/1.5	B
STS	Xp22.32	STS1 STS2	5′-CACAAGGTCAGTAATGCTGCAGG-3′ 5′-CCACATTGTTGAATTGAGTCACGATAG-3′	308	65/1.5	D
PGK1	Xq113	PGKA1A PGK1B	5′-CTTAGCATTTTCTGCATCTCCACTTG-3′ 5′-CATGCTGAGTAGTGAAACAGTGACA-3′	288	65/1.5	D
G6PD	Xq28	G6PD1 G6PD2	5′-CTACTTGGTTATCTAGTAGCCTTCTC-3′ 5′-GTTAATTGCTCAGTGTGATCAGATCGG-3′	275	65/1.5	C

a. 数据来自Theune等（1991），Dubois和Naylor(1993)。

b. NR表示未有报道。

c. 数字表示退火温度（℃）和RCR反应体系中最佳Mg^2浓度。

d. A表示引物序列源自内含子，B表示引物序列源自外显子，C表示引物序列源自5′端侧翼区，D表示引物序列源自信使RNA中3′端非翻译区。

支持方案 5　标记分析

可以通过检测一些特定染色体的存在检验杂种细胞，而检测特定的染色体是通过检测已知存在于这些染色体上的标记。一般可以检测到两个探针（每个染色体臂上一个）。利用可查的引物对通过 PCR 有效地完成这个检测。如有必要，也可以选择做 Southern blot 分析（附录 3G）。表 3.1.2 列出一系列在分析体细胞杂合体中可能用到的 PCR 引物。另外一个系列的引物公布在 Abbott 和 Povey（1991）。24 孔板的一个孔可产出足够的杂合细胞的 DNA，可供 10 次的 PCR 反应。单独一个管内就可以检测多个标记（不同大小的 PCR 产物），24 孔的一排孔能产出足够多的 DNA，来分析一个杂种体。获得 DNA 的步骤如下。

1. 去除培养基，用 PBS 洗培养板。
2. 向 24 孔板的每个孔内加入 100μl 含非离子洗涤剂的 PCR 缓冲液溶解细胞（配方见附录 1）。
3. 将溶液（黏稠的）转移至小离心管，55℃孵育 1h，95℃，10min。
4. 分装 DNA 溶液至小离心管，保存在－20℃。通常每个 PCR 反应使用 10～20μl DNA 溶液。

使用 PCR 引物进行 IRS 检测，将产生每条染色体的“PCR 核型”，通过琼脂糖凝胶电泳可观测到系列特异的扩增产物。这种图式可与已知组成的杂交图式进行比较，如 NIGMS 人类遗传变异细胞库的消减杂交图式。事实上，杂交分析对于检测包含一条或两条染色体的染色体含量而言是有用的。IRS-PCR 方法可被作为正常人分散的中期染色体的原位杂交探针使用，这为使用传统的细胞遗传学方法检测到的小染色片段的检测提供了替代方法。并可能检测到通过人 DNA 探针与分散的染色体杂交而检测不到的染色体系重排。

尽管标记分析很快速，但从出现的标记推断染色体的出现与否有其不足，这不能断定染色体的完整性。如果杂交核型不稳定，下一步分析要更进一步分离。

参考文献：Abbot and Povey，1991；Athwal *et al.*，1985；Gritz and Davies，1983；Kurdi-Haidar *et al.*，1993；Theune *et al.*，1991；Warburton *et al.*，1990

编者：Cynthia L. Jackson

第4章　细胞遗传学

这一章的目的在于介绍细胞遗传学（如染色体研究）中经典的和新兴的技术。由于在制备染色体标本所需的人体组织标本材料中，外周血最容易获得，因此该章单元4.1中的操作方法是开展临床和基础研究所必需的。该部分详细介绍了玻片的制作流程，其中也包含了任何一种细胞遗传学研究方法中最重要和可变的因素。

单元4.2涉及小鼠的细胞遗传学。在人类发育及肿瘤疾病的深入研究中，小鼠已经日益成为其必备的模型动物，核型分析的必要性是毋庸置疑的。尽管小鼠细胞遗传学不是一种常用技术，但它的价值似乎将说明它在众多实验室中的发展前景。

单元4.3介绍各种最常用的显带技术及其应用。各种不涉及同位素的原位杂交技术具体操作方法见单元4.4，包括应用荧光标记（荧光原位杂交，FISH）和酶切方法的分子探针检测等。对于间期细胞FISH应用中探针的排序也有详细介绍。

各种经过修饰的FISH方法，已用于进一步定位探针在间期非凝缩染色质上的位置，寻找两种不同基因组中DNA序列相对丰度的差异，结合探针检测的免疫组织化学方法，以及DNA序列在染色体上定向的研究中。在单元4.5，介绍了高分辨FISH分析在同一条染色体上不同基因排序中的应用；与完整的间期细胞核相比，染色质纤维从细胞核中释放出来，提供了一种更加精确的探针定位方法。单元4.6中，对多色FISH方法进行了注释，从非常实用的角度，针对在一个核型中确认人类的每一条染色体，讨论了如何设计组合探针，以及不同的分析系统。

诸如FISH这样的非放射性方法的广泛应用，使得在单个间期或有丝分裂期细胞水平上进行表型和基因型的评价成为可能。在单元4.7中，介绍了关于染色体形态抗体（morphology antibody chromosome，MAC）技术的各种方法，由此把基于免疫细胞化学或细胞化学方法的细胞表型分析与通过FISH或染色体显带技术的基因型分析结合起来。另外，还提供了前面提到的基于G显带的FISH操作方法。该技术在临床和研究材料的回顾性分析中具有重要意义。

有关比较基因组杂交（comparative genomic hybridization，CGH）技术在单元4.8中有介绍。在研究基因的重复与缺失方面，CGH是一中非常有效的方法，已经被许多实验室广为采用，尤其是在研究肿瘤基因组重排复杂性的实验室。

毋庸置疑，分子细胞遗传学技术将继续在临床细胞遗传学中发挥更多的作用，以及在人类基因组分子分析中发挥整合作用。期待这些技术为揭开遗传性疾病的最终奥秘提供有价值的洞察。

编　　者：Cynthia C. Morton

单元 4.1　经培养外周血细胞的染色体制备

尽管从其他细胞也可以制备染色体，但人类外周血白细胞是最容易同步化的，从而可以对其染色体进行高分辨分析。表 4.1.1 提供了优质染色体制备过程中可能遇到的问题及解决方案。

表 4.1.1　染色体玻片制备过程中问题解决指导

问题	可能原因	处理方案
通常		
无分裂相或很少；溶血有细胞碎片	标本较差	重新准备标本
	培养基不足	制备新鲜培养基；重新培养；减少每一份培养基的种血量
	培养基污染	制备新鲜培养基；重新准备标本；改进灭菌方法
分裂相很少	通气不足，养分不足	适度倾斜培养管；每日轻轻混匀培养基
无分裂相；多核细胞；少量 T 细胞	漏加促有丝分裂剂或失效	加入 PHA；换用新鲜 PHA
无分裂相；少量多核细胞；大量 T 细胞	漏加促有丝分裂剂或失效	收获细胞之前加入秋水仙素；用新鲜配制的秋水仙素
	低渗液低渗度太强；有丝分裂溶解	配制浓度准确的低渗液
	细胞收获过程中操作过于粗糙；有丝分裂破裂	重悬并轻轻混匀培养基
	细胞同步化试剂作用未解除	收获当天加入胸腺嘧啶；制备新鲜的胸腺嘧啶；省略细胞同步化步骤
无分裂相；有细胞碎片	固定剂存在污染	应用新鲜配制、高等级的甲醇和冰乙酸
制备玻片		
分散效果差；对比度过强；细胞质包裹	玻片晾干过快	减慢晾干速度；增加玻片湿度；降低玻片温度；于湿纸巾上晾干玻片
分散效果差；细胞堆积	细胞悬液过浓	适当增加细胞悬液中的固定剂
分散效果差	低渗液中离子浓度过高；细胞未膨胀；	配制浓度准确的低渗液
	固定不充分；	重新固定或 4℃固定过夜
	固定剂污染	应用新的高等级的甲醇和冰乙酸
分散效果差；染色体“黏着”	应用了过多的溴化乙锭	重新配制溴化乙锭；降低浓度；减少接触时间；省略溴化乙锭步骤
过度分散；分裂相破坏；对比度过小	玻片晾干速度过慢	将玻片置于手臂或玻片加热器上；轻轻摆动玻片
	低渗液低渗度过强；细胞溶解	配制新鲜低渗液

基本方案　外周血培养和分裂中期细胞收获

材料（标√的条目参见附录 1）

用 Vacutainer（Becton Dickinson）或加有不含防腐剂的肝素纳（25U/ml）的注射器，获取肝素化的全血

√完全的 RPMI/10% FBS（胎牛血清）培养基，含 50μg/ml 的硫酸庆大霉素，不含青霉素及链霉素

100×植物血凝素（PHA；Life Technologies），以无菌去离子水溶解（4℃保存）

√10μmol/L 氨甲蝶呤（可选）

√1mmol/L 脱氧胸嘧啶核苷（可选）

10μg/ml 秋水仙素（Life Technologies）

75mmol/L 氯化钾（KCl，室温可保存 2 周）

固定剂：3∶1（V/V）高效液相色谱级甲醇/冰乙酸（新鲜配制）

15ml 一次性无菌锥形聚丙烯离心管（不要用聚苯乙烯产品）

带有 21G 针头的 TB 注射器（VWR Scientific；不要用预先附带的 25G 针头）

注：除非有特殊要求，所有培养均应在设置有一定湿度，37℃，5% CO_2 的培养箱中进行，所有需要接触活细胞的试剂和仪器均要消毒灭菌。

1. 应用含有肝素钠的 Vacutainer 或含有 25U/ml 血的无防腐剂肝素钠（不要应用其他抗凝剂）的注射器，经静脉穿刺采集外周血。尽快开始培养（推荐），或 4℃保存不超过 4d。室温运输。
2. 用带有 21G 针头的 TB 注射器，接种 0.25ml 全血至无菌 15ml 聚丙烯离心管，内含 5ml 完全 RPMI，其中含有 10% FBS 及庆大霉素。≤3 周的新生儿加全血 0.2ml，任何一管中都不要超过 0.5ml。加入重新溶解的 100×PHA 0.05ml。

   每培养管可制作 3～5 张铺满的玻片（或更多张未铺满的玻片）。

3a. 标准样品：培养管倾斜 45°（一定的角度有利于空气交换并防止沉淀堆积）培养 2～4d（最佳 3d）。

3b. 新生儿：如描述的直接收获或培养 1～2d 后收获（2d 最佳）。

3c. 老年人：此年龄组的淋巴细胞对 PHA 的反应较慢，因此在培养 3～4d 后收获。

4. 可选方案：对于较长的染色体和更多的有丝分裂细胞，应用以下的方法（图 4.1.1）可获得更好的同步化细胞。收获前一天，加入 0.05ml 的 10μmol/L 氨甲蝶呤（终浓度为 10^{-7}mol/L）以阻断 DNA 复制。继续培养 16～18h（不超过 18h）。第二天，加入 0.05ml 的 1mmol/L 脱氧胸嘧啶核苷（终浓度为 10^{-5}mol/L）以解除氨甲蝶呤的阻断作用。继续培养约 4h（时间是关键因素）。
5. 培养 3～4d（第 3 步），或同步化（第 4 步）后，直接加入 10μg/ml 秋水仙素 25μl（终浓度为 0.05μg/ml），启动收获，孵育 30min。室温 180g 离心 8min，弃上清。
6. 于室温加入 75mmol/L KCl 溶液 6ml，并轻轻地使细胞重悬。室温静置 15min，根据沉淀物体积调整 KCl 体积以达到最佳条件，比延长时间更有效。
7. 用巴氏管加入固定剂 10～12 滴，混匀。离心，同第 5 步。

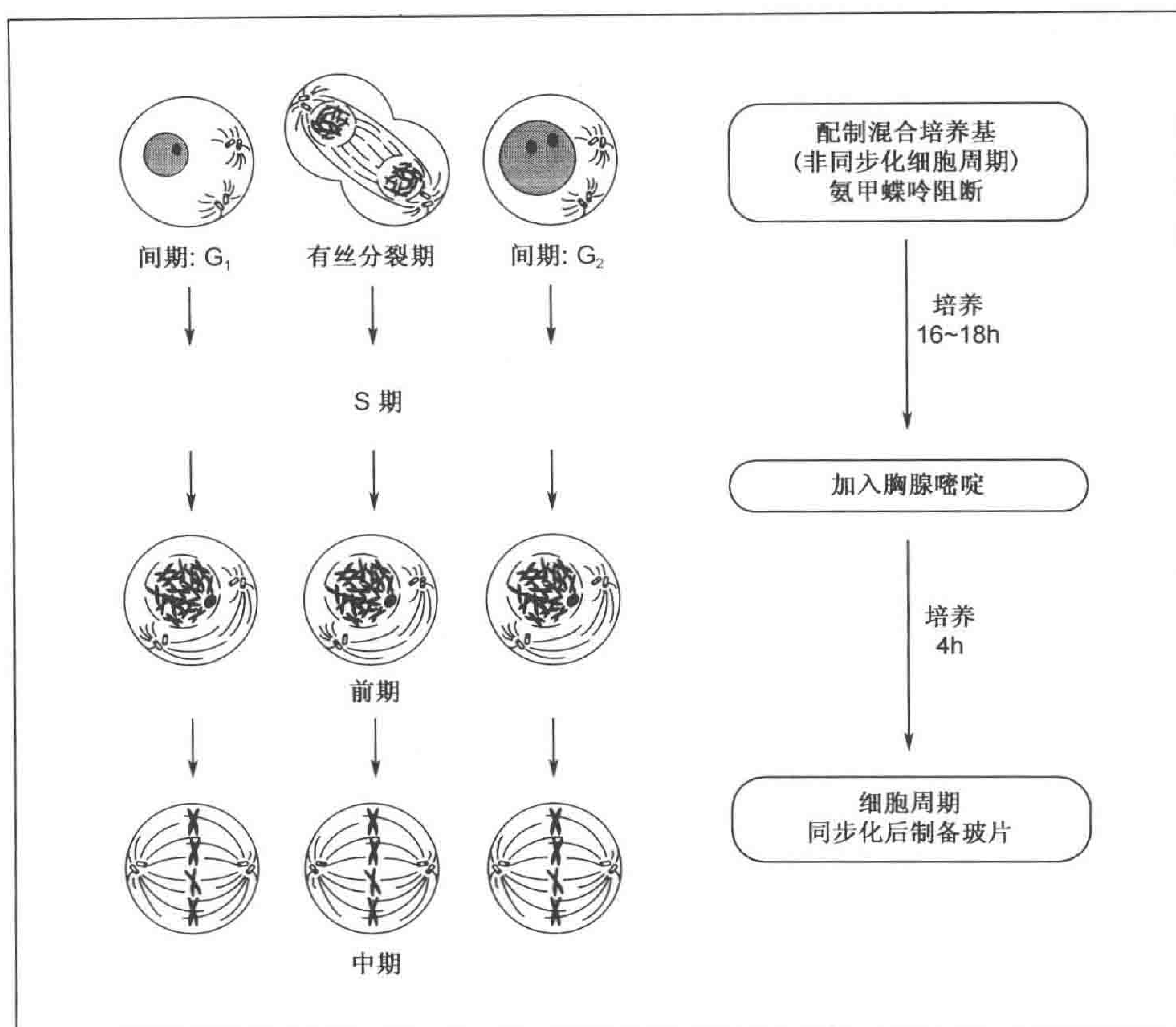


图 4.1.1　细胞培养同步化。培养 2～3d 后加入抑制胸腺嘧啶合成的氨甲蝶呤，阻断细胞周期非同步化的淋巴细胞。耗尽胸腺嘧啶阻止细胞完全复制，使细胞集中在细胞周期的 S 期。随后加入的胸腺嘧啶使细胞同步完成完全复制，经过 G_2 期进入有丝分裂期。

8. 保留 0.5ml 上清，利用巴氏管轻轻吹吸，使棕色的块状物重新悬浮。避免吸入过多而使其黏附于玻璃管上。勿将吸管前端紧压管底。加入 1ml 固定剂并立即轻轻混匀，以固定剂调整体积至 5ml 并混匀。离心，同第 5 步。
9. 弃上清，以 5ml 固定剂重悬沉淀物，离心，同第 5 步。
10. 弃上清，以适当体积固定剂重悬沉淀物至类似稀牛奶的混悬液。室温静置 30min，或 4℃过夜（较长固定时间有利于染色体分散）。
11. 制片，分析分散开的染色体（支持方案）。

支持方案　染色体玻片制备

此方法适用于多种方法培养的细胞：外周血、骨髓（单元 10.1）、腹水、胸水、羊水（单元 8.2）和培养瓶收获细胞（单元 8.1、单元 8.3 和单元 10.2），杂交或放射杂交体细胞（单元 3.1），淋巴细胞株，非人类的杂交瘤细胞。总之，该方法适合于任何经培养、固定的有丝分裂细胞悬液制备染色体玻片。

材料

准备好的培养剂（基本方案）

固定剂：3∶1（V/V）甲醇/冰乙酸（均为分析纯级试剂，J. T. Baker）

载玻片（一端磨砂处理）置于存有 100%甲醇（均为分析纯级试剂，J. T. Baker）的染色缸中

Zeiss 标准相差显微镜，配有 16×Ph2 的物镜和聚光器（或等效工具）

1. 从甲醇中取出玻片，用不含棉的绒布擦净（玻片务必洁净）。再次将玻片浸入甲醇，然后以去离子水反复冲洗，直至将甲醇冲净，并且在玻片表面留有均匀的一层水膜。
2. 以拇指和食指拿住玻片磨砂的一端，倾斜玻片使其长边与工作台面平行，用吸水纸接触玻片下侧长边，吸干玻片上多余水分。使玻片倾斜于工作台面呈 30°角，并使玻片下侧的长边与吸水纸保持接触，有水层的一面向上（图 4.1.2）。

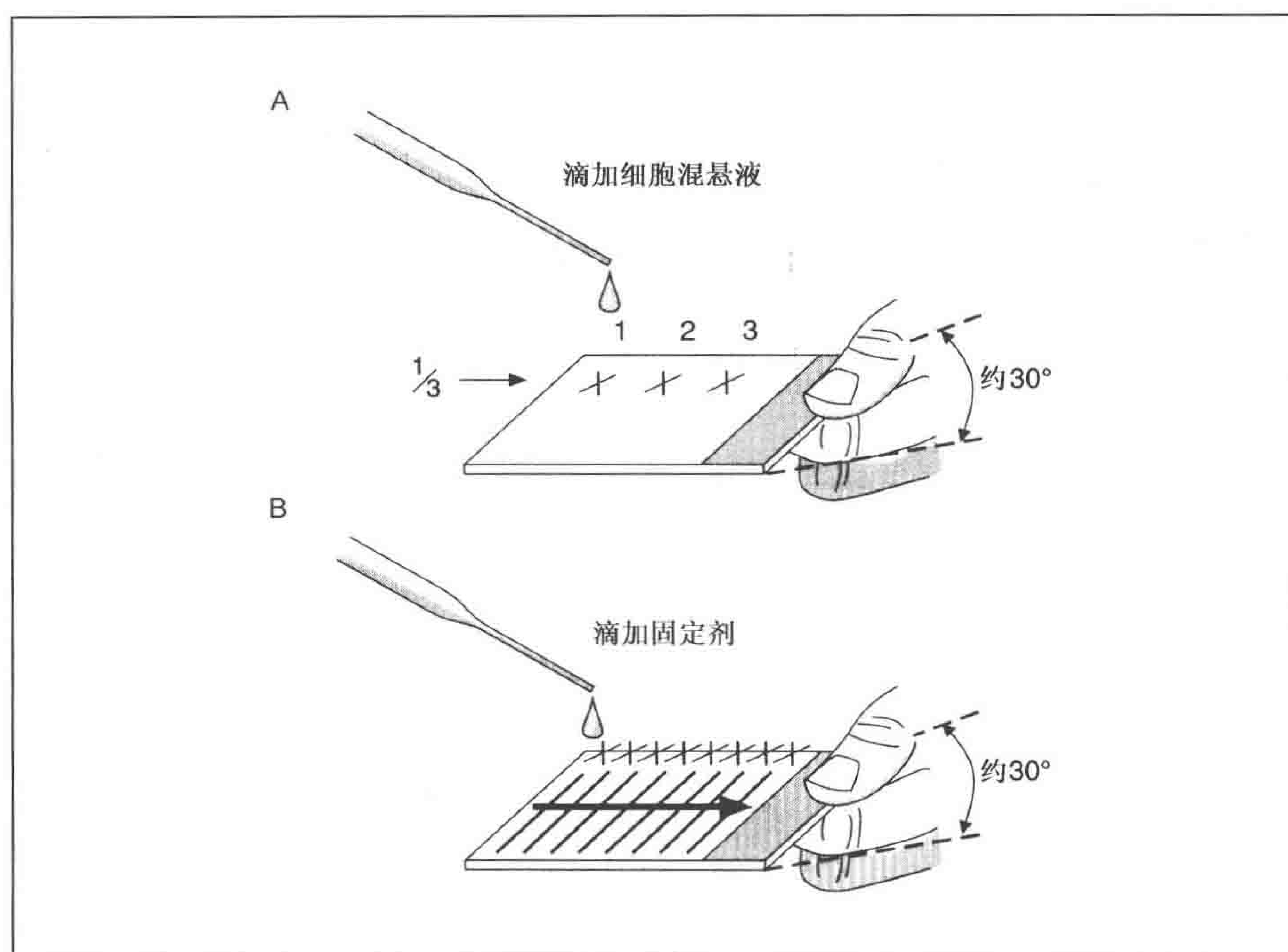


图 4.1.2　染色体玻片制备。A. 靠近玻片长边吸水，直至留下一薄层均匀水膜，将玻片倾斜至 30°，依次由外侧向有磨砂的一端滴加细胞悬液 3 滴；B. 滴加细胞悬液后，由玻片的上端用固定剂冲洗，方向依然是向着有磨砂的一端。避免使玻片表面留有过多的液体，使其形成均匀的固定剂薄膜，以确保均匀干燥。

3. 水平持巴氏管于玻片上方 1～2in 处，连续、均匀滴加细胞混悬液 3 滴，移动方向朝向磨砂一端。每一滴平均占有玻片的 1/3 宽度，滴在倾斜玻片上的液滴，在其接触到玻片的同时拨散开来。如果细胞分散的面积集中在液滴滴下位置，液滴周围细胞较少，则应在滴片时减小玻片与工作台之间的角度（<30°）。

4. 吸去多余的固定剂，按照第 2 步使玻片倾斜 30°，滴加新鲜配制的固定剂，用巴氏管一滴一滴地滴加。从抬高的无磨砂的一端开始移向磨砂的一端，滴在玻片抬高的边缘，形成均匀的固定剂的前端。
5. 再次吸干玻片下侧长边边缘水分，并将玻片背面擦干。将玻片磨砂端向上倾斜 30°，滴有细胞的一面向上，于空气中晾干，使其充分分散。如果玻片周边细胞分散效果不佳，可参见表 4.1.1 操作（如调整温度为 20～22℃，相对湿度为 50%）。
6. 在相差显微镜下寻找形态及分散良好的染色体观察。挑选染色体分布均匀、一致、密度适中且没有染色体相互重叠的玻片，为了利于获得理想的染色体条带或杂交信号，理想的染色体应平整、条带分明、着色一致。
7. 玻片储存在清洁、干燥、阴暗处，室温（短期）或－70℃冻存（长期）保存。

参考文献：Barch *et al.*，1997

编　　者：Charles D. Bangs and Timothy A. Donlon

单元 4.2　小鼠细胞染色体制备及核型分析

注：在所有操作过程中，注意无菌操作，直至收获染色体。

基本方案 1　培养以及小鼠外周血分裂相细胞收获

小鼠外周血淋巴细胞可由以下任何一种促有丝分裂剂刺激增殖：T 细胞刺激因子植物血凝素（PHA）；刀豆素 A（Con-A）；B 细胞、T 细胞刺激因子脂多糖（LPS）；美洲商陆等促有丝分裂剂。

材料（标√的条目参见附录 1）

√完全的 RPMI
√PHA 溶液
√浓度为 750μg/ml 的 LPS
√FBS
雌性（推荐）小鼠（表 4.2.1），7～10 周龄（可选；按需求可用 5 周或 2 岁的小鼠）
√500USP U/ml 肝素钠溶液
√50μg/ml 秋水仙碱溶液
0.075mol/L（0.56% *m/V*）KCl 溶液，需新鲜配制，37℃
固定剂：3∶1（*V/V*）甲醇/冰乙酸，需新鲜配制
16mm×125mm 聚苯乙烯组织培养管，带有可旋紧的盖子（Fisher）
75μl 肝素化的微量毛细分血管（Fisher）
有盖的 12mm×75mm 无菌管（Fisher）
5ml 锥形玻璃离心管（如 Kimax、Fisher）
清洁的显微镜玻片（如 Fisher）
相差显微镜，带有 10×或 20×的物镜，如需打印清晰染色体图还需要 40×的物镜

表 4.2.1　不同品系淋巴细胞增殖对 PHA 刺激的反应[a]

较差	中等	良好
AU/SsJ	A/HeJ	129/J
BDP/J	A/J	AKR/J
C3H/HeJ	CBA/J	BALB/cJ
CBA/CaJ	LP/J	BUB/BnJ
CBA/H-T6J		C57BL/6J
CE/J		C57BL/10J
DBA/1J		C57BL/10Sn
DBA/2J		C57BL/KS/J
I/LnJ		C57BR/cdJ
LG/J		C57L/J
LT/ChRe		C58L/J
MA/J		CE/J
NZB/B1NJ		HRS/J
P/J		PL/J
RF/J		PRO/Re
SEA/GnJ		RIII/J
SEC/ReJ		WB/Re
SJL/J		WC/RE
SM/J		WH/Re
ST/bJ		
SWR/J		

a. 选自 Heiniger 等（1975）。获得牛津大学出版社许可，复印于 Akeson 和 Davisson（2000）。

1. 对于每一个小鼠标本，用一个 16mm×125mm 组织培养管，其内有：
   0.95ml RPMI；
   0.1ml PHA 溶液；
   0.1ml LPS 溶液（750μg/ml）；
   0.15ml FBS。
   接种前需冷藏。
2. 用两只 75μl 肝素化的微量毛细管分血器分别从每只小鼠的两个眼眶静脉窦采集血液（图 4.2.1；体重 30g 的小鼠可采集 300μl 血液）。接种至含有 0.1ml 500USP U/ml 肝素钠的 12mm×75mm 无菌管中。

   注： 如果不能熟练操作，可从小鼠尾静脉采血（备选方案 1）。
3. 旋紧管盖，轻轻摇动管子，使血液与肝素充分混匀。室温保存（不超过 2h），直至接种至培养基。
4. 接种 0.2ml 肝素化血液至准备好的培养管中。旋紧管盖，轻轻摇动管子，使细胞与培养基混匀。

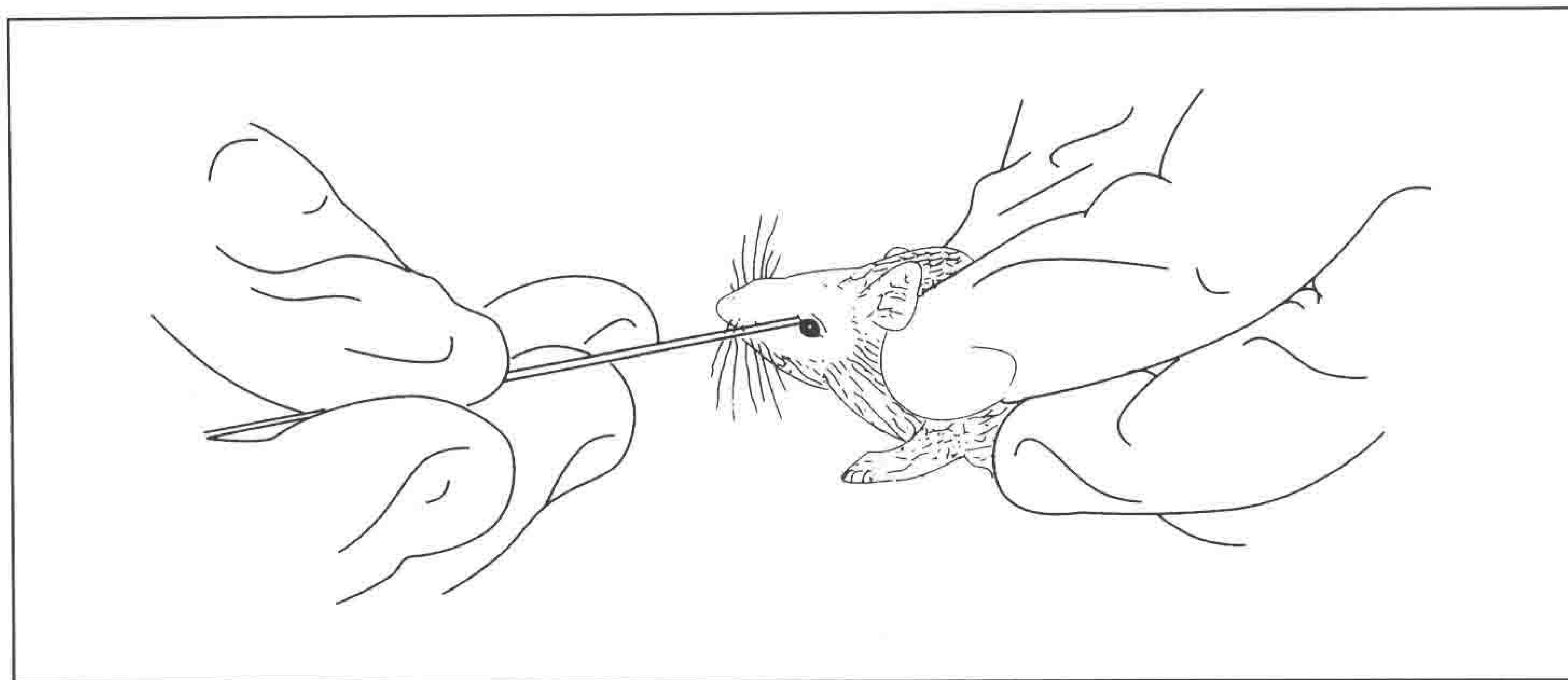


图 4.2.1　从小鼠眼眶静脉窦采集血液。

5. 将培养管倾斜 45°角（倾斜有利于气体交换，且防止细胞沉积），于 37℃水浴摇床培养 41～43h。设置摇床前后转动速度为 32～35 次/min。平均每日至少用手摇匀培养管 3 次，使细胞重悬。

　　如果在染色体玻片上观察到大量的有丝分裂前期细胞（核大而苍白），表明细胞培养时间不充分。如果观察到多数分裂晚期染色体，表明培养时间过长。

6. 于每一个培养管中加入 50μg/ml 的秋水仙素溶液 0.15ml，继续 37℃培养 15～20min。将培养基转移至 5ml 锥形玻璃离心管，室温 400*g* 离心 10min。
7. 弃上清，轻轻加入 2～3ml 预热的 0.075mol/L KCl，用巴氏管轻轻吹吸混匀细胞，37℃孵育 15min。室温 500*g* 离心 10min。小心弃上清，勿触及下层沉淀之上的棕黄（白色）色薄膜。
8. 于管底轻轻加入固定剂 3～4ml，轻柔但迅速吹吸使其充分混匀。旋紧盖子，室温静置至少 30min，如有必要，可于 4℃保存 2h。
9. 室温 400*g* 离心 10min，弃上清（固定剂），加入新配制的固定剂 2～3ml 混匀细胞。重复此第 2 步次。
10. 将细胞室温 400*g* 离心 8min 后，以 1/3～1/2ml 新鲜固定剂重悬细胞。如果不立即制备染色体玻片，可不进行最后的步骤，直至制备玻片之前再进行。如果隔日制备玻片，过夜前应洗涤细胞至少 2 次。
11. 制备染色体玻片前，将玻片浸入固定剂 15min 以上，用 Kimwipe 或不含棉绒纸擦干。
12. 用巴氏管将小滴细胞悬液滴加至玻片上，并使其分散。如果在玻片边缘出现水泡，则应减少滴加量。一旦液滴开始收缩，出现牛顿环（液滴边缘出现彩虹颜色，因色差而起着色现象），应立即吹干或摇动玻片使其迅速晾干，此步骤对于获得分散良好的中期染色体至关重要。

　　选择方案：要增加染色体的分散度，可将玻片平置，在细胞悬液开始晾干时滴加很小的一滴固定剂（如“炸弹”方法）。

13. 重复第 12 步，直至将所有样品都滴加至玻片上（多加几滴稀释的细胞悬液的效果

优于只加几滴浓缩的细胞悬液），于相差显微镜下观察细胞的浓度以及染色体的分散程度。以细胞的浓度来评价玻片制备的优良，而不是以分裂相的多少作为指标。

14. 在进行 G 显带之前，可将玻片在室温保存 7～10d（基本方案 2）。进行 FISH 分析，可室温存放玻片 2～4 周（本文作者应用干燥器），以防止过度变性。如要长期保存（如 4 周至 1 年），应将玻片－20℃冷冻保存。

备选方案 1　由尾静脉采集血液

材料（标√的条目参见附录 1）

雌性小鼠，7～10 周龄
70％乙醇
√500USP U/ml 肝素钠溶液
广口瓶
台灯
控制装置
保险刀片
有盖 12mm×75mm 无菌管（Fisher）

1. 将小鼠至于大的广口瓶内，在台灯下照射 1～2min，使其温暖（如直至使其表现过度活跃，搔抓鼻子）。但避免过热，以免小鼠休克或死亡。
2. 将小鼠至于控制装置中使其尾部活动自如（图 4.2.2）。用 70％乙醇清洗尾部，用干净的 Kimwipe 擦拭 2 次。用 70％乙醇擦拭保险刀片，于尾巴末端，从侧面轻轻切开静脉约 1in（1in＝2.54cm），滴下一滴血液。

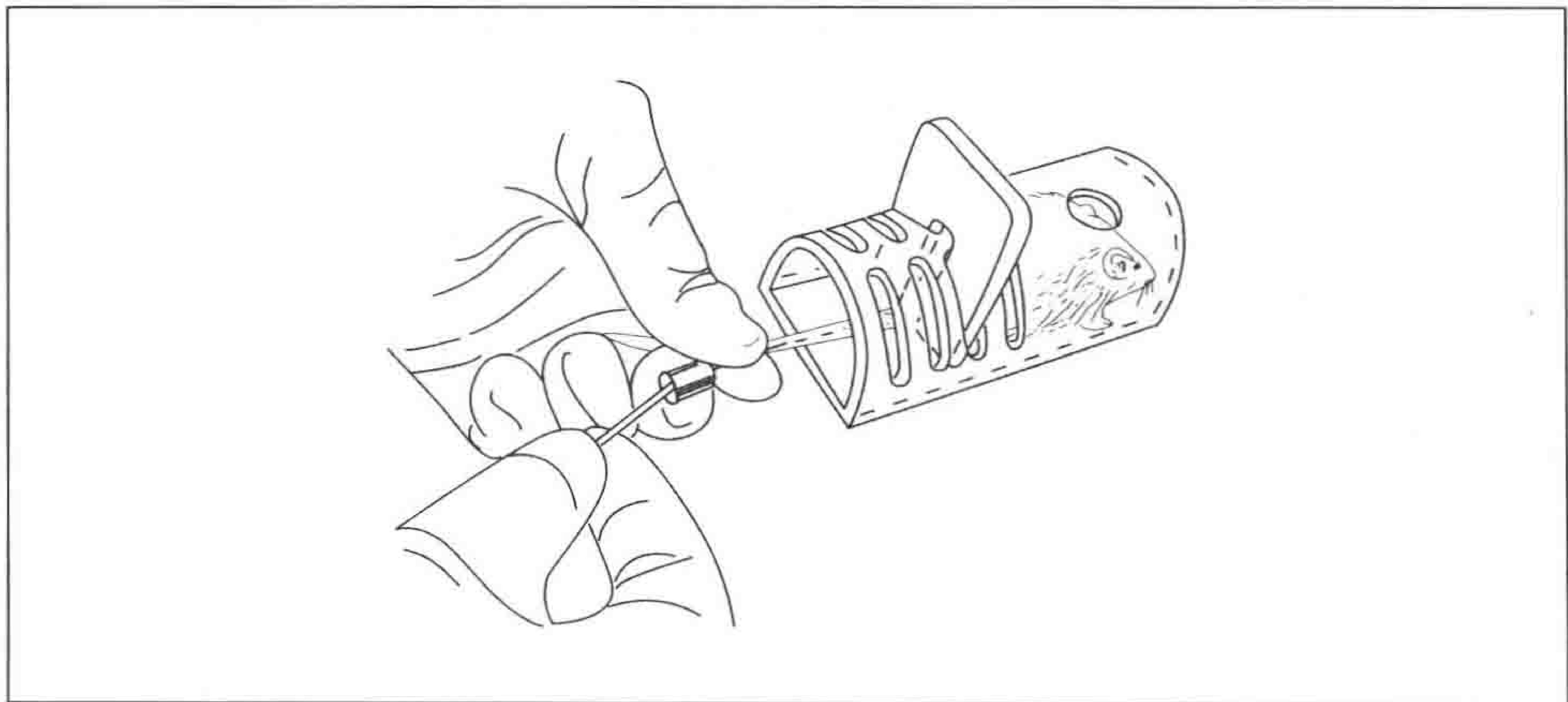


图 4.2.2　从小鼠尾静脉采集血液。

3. 用内有 0.1ml 500USP U/ml 肝素钠的有盖 12mm×75mm 无菌管，采集 0.15～0.3ml 血液（5～10 滴），使血液沿管壁流入肝素钠溶液中。注意勿使小鼠尾部接触到管口。
4. 用前面介绍的方法培养肝素化血液（基本方案 1）。

备选方案 2　由胚胎肝脏制备染色体

用小鼠胚胎肝脏制备的染色体比较长，而且带纹明显，质量常常优于从外周血淋巴细胞制备的染色体。在胚胎 14d 至出生期间，胚胎肝脏的有丝分裂指数最高。出生后，有丝分裂活动恢复，可从 5 日龄以内的小鼠获得合适的肝脏标本。小于 14d 胎龄的小鼠胚胎，几乎任何组织都有足够的分裂相可用于核型分析。

附加材料（见基本方案 1；标√的条目参见附录 1）

雌性小鼠，妊娠 14d（支持方案）
√0.5%（*m*/*V*）秋水仙素溶液
√含有 0.025%（*m*/*V*）秋水仙素溶液的 EDTA 缓冲液（可选）
任何一种培养基，37℃
6∶1（*V*/*V*）甲醇/冰乙酸（可选）
摘除胚胎肝脏的手术器械
60mm 的解剖盘
小玻璃盘（直径 35mm）
Dewecker 虹膜剪
15ml 锥形离心管（如 Corning）

1a. 注射法：向雌性孕鼠腹膜内注射 0.1ml 0.5%的秋水仙素溶液，以干扰纺锤体形成。等待 10～15min，吸入 CO_2 窒息或颈脱位法使其安乐死。取出胚胎并以断头术处死。
1b. 非注射法：不对孕鼠进行注射，如第 2～4 步所述方法采集细胞，并于含有 0.025%（*m*/*V*）秋水仙素溶液的 1ml EDTA 缓冲液中 37℃培养 10min。直接进行第 5 步。
2. 取出胎鼠肝脏，将钳状骨针夹住肝脏两侧并夹捏使肝脏由皮肤迸出。去除任何额外组织，将肝脏至于盛有预温的培养基的 60mm 的解剖盘中。
3. 清洗肝脏去除血液和组织碎片。将洗净的肝脏放在小玻璃盘（直径 35mm）中，其内盛有一满巴氏管（9in）的培养基。
4. 剪碎组织。用尖端折断的巴氏管向盘底反复吹吸数次，进一步破坏组织。避免产生气泡，以防止细胞困在其中。倾斜盘面使大块的组织沉淀，吸取带有悬浮细胞的上层液体，移入 15ml 锥形离心管。
5. 400*g* 室温离心 10min。弃上清。用手指轻弹管底使沉淀重悬，加入一管预热的 0.075mol/L KCl 溶液，轻轻混匀，室温静置 12～15min（时间过长会导致细胞破坏）。
6. 如上所述，离心，弃上清。用 1/2 管固定剂漂洗 2 次，但不触动沉淀团块。再加入 1/2 管新鲜固定剂静置 5～10min，直至沉淀完全成为白色。
7. 弃上清。用手指轻弹管底使沉淀重新悬浮，加入 1/2 管新鲜固定剂，轻轻吹吸。如前所述，离心，重复洗涤 3 次。
8. 弃上清，加入 3～5ml 固定剂，使大的团块下沉勿混匀。如需要增加分散度，可用 6∶1 的甲醇/冰乙酸溶液。

9. 按照前面的方法准备玻片（基本方案 1，第 11～15 步）。用以上悬液可制备一张以上的玻片。利用相差显微镜观察细胞密度（不是中期染色体数量），以确定制备每张玻片所需的最佳悬液量。

支持方案　小鼠定时交配

为了使小鼠交配，在下午晚些时候，将一只 6～8 周龄的雄性小鼠放入装有两只雌性小鼠的笼中。检查雌性小鼠的阴道，如为张口状并有显著的粉红色条纹，即可确定其在发情期。次日清晨（9 点钟）检查雌鼠阴道是否有呈米粒状的阴道塞。如有必要，可用一钝金属探针拨开阴唇观察阴道塞。如果没有明显的阴道塞则分开雌雄小鼠，于下午晚些时候使其再次交配。将发现阴道塞的当天命名为第 0 日，计数日期，确定处死雌性孕鼠的日期，以提供 14d 胎鼠。触诊雌鼠的腹部，受孕后 12～14d 可以触摸到形如小肿块的胚胎。

备选方案 3　由骨髓制备染色体

此方法不需要进行细胞培养，操作相对比较简单，适合于初学者或不经常进行染色体分析的研究人员采用，且可用于任何年龄以及性别的小鼠。然而，G 显带染色体制备稳定性逊色于外周血淋巴细胞和胚胎肝脏细胞。

附加材料（见基本方案 1；标√的条目参见附录 1）

√0.5%的秋水仙素溶液
手术工具
带有 23G 针头的 1ml 注射器
15ml 锥形离心管（Corning）

1. 向小鼠腹膜内注射 0.5%的秋水仙素溶液 0.1ml，等待 30min（年轻小鼠 20min，如 3 周龄小鼠，但不能超过 1h）。
2. 吸入 CO_2 窒息或颈脱位法使小鼠致死，取出股骨和胫骨。
3. 去除骨骺端，将 23G 针头插入骨髓腔。
4. 用吸有 0.075mol/L KCl 溶液的 1ml 注射器将细胞冲洗进入 15ml 锥形离心管内。
5. 室温培养 15min（如果室温低可于 37℃培养）。
6. 室温 400*g* 离心 10min。弃上清，加入 0.5ml 固定剂，但不触动沉淀团块。3～4s 后去除固定剂，再加入新鲜配制的固定剂，不触动沉淀团块。
7. 将离心管室温静置 30min。如果细胞须留于固定剂中超过 30min，则需冷藏。
8. 室温 400*g* 离心 5min。弃上清并加入新鲜固定剂，重复洗涤 3 次，最后一次加入最适量的固定剂，制成浓度较稀的细胞悬液。
9. 如前所述制备并评价玻片制备的优劣（基本方案 1，第 11～15 步）。用这些细胞悬液可制备一张以上的玻片。利用相差显微镜观察细胞密度（不是中期染色体数量），以确定制备每张玻片所需的最佳悬液量。

备选方案 4　从成体组织或实体瘤组织制备染色体

分裂中期染色体亦可以从成年小鼠任何具有有丝分裂活性的组织（如脾脏或肿瘤）获得。分裂相少于骨髓或胚胎肝脏，且显带染色体制备也不如由外周血淋巴细胞和胚胎肝脏细胞制备稳定性好。

附加材料（见基本方案 1）

任何一种培养基，37℃
取肿瘤或组织用的外科手术工具
47mm 解剖盘
小玻璃盘（直径 35mm）
Dewecker 虹膜剪
15ml 锥形离心管（Corning）

1. 吸入 CO_2 窒息或颈脱位法使小鼠致死，取出实体瘤或所需组织。
2. 在盛有预热的培养基的 47mm 解剖盘中清洗组织，以去除任何多余的组织。
3. 清洗以去除血液和碎片。将洗净的肿瘤组织放在小玻璃盘（直径 35mm）中，其内盛有一满巴氏管（9in）的培养基。
4. 剪碎组织。用尖端折断的巴氏管向盘底反复吹吸数次，进一步破坏组织。避免产生气泡，以防止细胞困在其中。
5. 倾斜盘面使大块的组织沉淀，吸取带有悬浮细胞的上层液体，移入 15ml 锥形离心管。
6. 400*g* 室温离心 10min。
7. 弃上清后，用 2ml 培养基使细胞重悬。
8. 加入 50μg/ml 的秋水仙素 0.2ml，37℃培养 30～60min。
9. 如前所述离心、弃上清。加入 2～3ml 预热的 0.075mol/L 的 KCl 溶液，轻轻混匀，37℃培养 15～20min。
10. 如前所述离心、弃上清，但不触动沉淀团块。沿管壁轻轻加入 3～4ml 固定剂溶液，迅速但轻柔地吹吸以防止细胞凝集。
11. 旋紧管盖，室温静置 30min，放置超过 30min 时需冷藏。
12. 400*g* 室温离心 5min，移去固定剂，加入新鲜固定剂使细胞重悬。重复洗涤 3 次。
13. 弃上清，加入适量固定剂制成可制备染色体玻片的细胞悬液。制备玻片之前，先使大的团块沉淀，勿再次混合细胞悬液。
14. 如前所述制备并评价玻片制备的优劣（基本方案 1，第 11～15 步）。用这些细胞悬液可制备一张以上的玻片。利用相差显微镜观察细胞密度（不是中期染色体数量），以确定制备每张玻片所需的最佳悬液量。

基本方案 2　GIEMSA 显带（G 显带）

材料（标√的条目参见附录 1）

分裂中期染色体玻片（基本方案 1 或备选方案 1～4）

√2×SSC，60～62℃

0.9%（m/V）NaCl

√胰蛋白酶/Giemsa 溶液

磷酸盐缓冲液：1∶1（V/V）Gurr 磷酸盐缓冲液，pH 6.8（生物/医学专业），以去离子水配制

玻片染色缸

亮视野显微镜、20×物镜、100×油镜，以及绿色滤光片

1. 于室温存放染色体玻片 7～10d。
2. 在盛有 60～62℃的 2×SSC 溶液的广口瓶中孵育玻片 1.5h，每个广口瓶中盛放玻片不超过 7 张。
3. 将玻片转移至 0.9% NaCl 溶液中（室温），用新配制的 NaCl 溶液冲洗玻片并晾干。
4. 将玻片在胰蛋白酶/Giemsa 溶液中染色，在将玻片放入广口瓶中之前，用棉球将染色液表面类似金属的薄膜去除，或在取出玻片之前用流动水将薄膜冲掉。
5. 将所有玻片移入新配制的磷酸盐缓冲液中。
6. 将每一张玻片用磷酸盐缓冲液彻底冲洗 2 次。甩去多余水分，用吹风机吹干玻片。
7. 在亮视野显微镜下用 20×物镜观察显带的染色体，在玻片上滴加镜油，在 100×油镜下分析染色体。用绿色滤光镜可获得比较好的条带分辨率。用洁净的丙酮去除镜油后，保存玻片。

不同凝集阶段的染色体显带模式图可查询（Cowell，1984；Sawyer et al，1987；http://www.informatics.jax.org）。

参考文献：Cowell，1984；Evans，1996；Hogan et al.，1994；Lee et al. 1990

编　者：Ellen C Akeson and Muriel T. Davisson

单元 4.3　染色体显带技术

该部分提供的所有技术适合于从任何来源的组织（单元 4.1 和第 8 章）制备中期和早中期染色体（加长的，高分辨）。可根据需要和可用的设备选择不同的染色技术（光镜或荧光显微镜）。其他的染色体鉴别技术包括 G-11 显带（单元 3.1），以及应用特异染色体探针的荧光原位杂交技术（单元 4.4）。核型作图和染色体分析方法在附录 3K 部分，以及在对不同组织应用特殊细胞遗传学分析的章节中（如单元 8.2）

注意：此单元中应用到的有危险的试剂包括：BrdU、DAPI、偏端霉素 A、H_2O_2、人类淋巴细胞和成纤维细胞、Hoechst33258、喹吖因（quinacrine）和二甲苯。

注：除特殊需要，所有的细胞培养均在加湿、有 5%CO_2的 37℃温箱内进行。

基本方案 1　喹吖因显带（Q 显带）

材料（标√的条目参见附录 1）

晾干的中期染色体玻片（单元 4.1）

√喹吖因溶液

√McIlvaine 缓冲液，pH5.6（pH 为 5.4～5.6 是很关键的）

镜油，弱荧光

玻片染色缸

盖玻片，0 号或 1 号

荧光显微镜，带有 430～460nm 激发光滤片，小于 500nm 的吸收滤片，以及装有胶片的相机

1. 将晾干的中期染色体玻片放入盛有喹吖因溶液的玻片染色缸中，室温放置 5min。
2. 在一个装有水的染色缸中反复浸沾洗涤玻片。再次用水清洗。空气晾干。如需要，可在避光、干燥处保存数周。
3. 用 pH5.6 的 McIlvaine 缓冲液封固玻片，轻轻加盖一 0 或 1 号的盖玻片，用纸巾吸去盖玻片下多余的缓冲液。
4. 在装有适合滤片的荧光显微镜下观察并拍照。如果可以，可用虹彩光圈或漏斗状的物品减小荧光的眩光。如果用 Kodak ASA200 胶卷，在 100×的物镜下，曝光时间在 15～30s。如果相机有自动曝光系统，束点测量模式，将一个染色体放在束点下，按需要调整 ASA 设置。定时拍照（如灯光改变时）。
5. 观察完毕后，取下盖玻片，干燥、避光处保存玻片。再观察时可再次封片。

基本方案 2　应用 GTG 技术进行吉姆萨显带（G 显带）

G 显带后可以脱色，并进行（支持方案 6）Q 显带（基本方案 1）。

材料（标√的条目参见附录 1）

√HBSS

√胰蛋白酶溶液

70%和 90%（V/V）乙醇

2%（V/V）吉姆萨染色液（生物/医学专用或 Fisher；用之前以水溶解）

制备好的中期染色体玻片（支持方案 1 和 2）

Xylene 或 Hemo-De

染色缸

光学显微镜，绿色干扰滤光片

细粒度胶片（如 Kodak Technical Pan）

注：进行吉姆萨染色时注意戴手套，以防止其沾染皮肤，难于清洗。

1. 准备几个染色缸，依次装有如下溶液，放置于室温：

HBSS；

胰蛋白酶溶液；

HBSS；

70%乙醇；

90%乙醇；

2%吉姆萨染色液；

水。

2. 将制备好的中期染色体玻片放入 HBSS 约 10s。
3. 将老化的玻片移入胰蛋白酶溶液中，骨髓制片孵育 30s，淋巴细胞或羊水细胞孵育 60s，由其他长期组织培养而来的细胞孵育 90s。如需要，用 3～5 张同样的玻片来确定最佳的胰蛋白酶消化时间。避免胰酶消化不足（导致没有条带）或胰酶消化过度（导致染色体肿胀、染色体周围区域着色）。
4. 依次在盛有 HBSS、70%乙醇和 90%乙醇的染色缸中漂洗玻片，在每一个染色缸中浸沾 3 或 4 次。空气晾干。如需要，可存放数小时。
5. 将玻片放入吉姆萨染色液中 4min，或根据经验确定最佳染色效果的染色时间。
6. 将玻片放入水中约 30s，空气晾干，可存放数月或数年。
7. 滴加镜油，直接在光镜下观察，应用绿色干扰滤光片可获得黑白照片，用细粒度胶片，采用 ASA50～100 的背景以及较短的曝光时间。用二甲苯或 Hemo-De 清洗镜油后，保存玻片。

备选方案 1 用瑞特（Wright）染色剂进行 G 显带

此种 G 显带方法得到的染色体轮廓鲜明，可改善普通 G 显带方法的不足。同样可用于 G 显带脱色后的（支持方案 6）Q 显带（基本方案 1）。

附加材料（见基本方案 2；标√的条参目见附录 1）

√Bacto 胰蛋白酶溶液
√Sorensen 磷酸盐缓冲液，pH 6.8
√Wright 染色液（新鲜配制）

1. 将老化的玻片放入盛有 Bacto 胰蛋白酶溶液的染色缸中 20～30s，然后在 pH6.8 的 Sorensen 磷酸盐缓冲液中晃动、漂洗。
2. 将玻片水平放入新鲜配制的 Wright 染色液中 40～60s（溶液由于水与乙醇之间的反应放热，而感到微温）。
3. 在水中轻轻摇动、清洗玻片，空气晾干，可保存数年。
4. 按前述方法观察并拍照（基本方案 2，第 7 步）。

支持方案 1 加热法老化玻片

存放、加热及干燥均可使染色体改变（可能是由于蛋白质变性），从而影响条带。时间不够的玻片可出现条带模糊、失真。时间过久可导致无条带。不同技术对时间的要求变化范围很大，最佳时间的确定可因不同细胞类型或组织来源而变化。

将空气晾干的中期染色体玻片在 55℃孵育 2d，或 90～95℃孵育 20min。如有需要，可缩短孵育时间，提高孵育温度。如果孵育时间超过 2d（如遇到周末），应降低孵育温度。不同实验室可根据经验建立最佳时间和温度条件。

支持方案 2 用过氧化氢老化玻片

如需对玻片立即显带，用过氧化氢处理玻片，可得到同样的老化效果。

材料

空气晾干的中期染色体玻片（新制备的，单元 4.1）

15%（V/V）H_2O_2（用之前以30%的H_2O_2 1∶1稀释）

染色缸

50℃加热盘或玻片加热器

1. 用新鲜配制的15%H_2O_2直接冲洗玻片，使其接触过氧化氢，7min。
2. 将玻片放入盛满水的染色缸中，用自来水冲洗2min。
3. 将玻片放在50℃加热盘或玻片加热器上1h或过夜。降至室温后可进行染色。

基本方案3　B-PULSE淋巴细胞迟复制显带

此方法可制备淋巴细胞R显带染色体玻片。失活X染色体着色较淡，因而可用于区分女性的两条X染色体。在细胞周期的晚S期，于培养基中加入BrdU。

材料

加有植物血凝素（PHA）的淋巴细胞培养基（单元4.1）

10mmol/L BrdU（10ml水中加入30.7mg，1ml等分保存，－20℃可保存6个月）

10mmol/L 2′-脱氧胞苷酸（dC；10ml水中加入28mg，1ml等分保存，－20℃可保存6个月）

10μg/ml秋水仙素溶液（如Life Technologies；4℃保存）

合适容积的组织培养瓶

注：所有经BrdU处理的细胞应避免荧光光源发出的313nm光线照射。所有接触细胞的试剂和设备均需灭菌处理。

1. 在合适容积的组织培养瓶中制备PHA处理的淋巴细胞培养基，孵育2d。
2. 在第3天的上午9点钟，在每一个培养瓶中加入10mmol/L BrdU和10mmol/L dC，终浓度分别为100μmol/L。孵育6h。
3. 加入10μg/ml秋水仙素，终浓度为0.05μg/ml，37℃孵育30min。
4. 收获分裂中期细胞，制备染色体玻片。
5. 使BrdU复制的染色体显带（支持方案3～5）。

备选方案2　T-PULSE淋巴细胞迟复制显带

此法用于制备G显带或Q显带染色体。将失活的X染色体突出显色，从而区分女性的两条X染色体。在细胞周期的早S期，在培养基中加入BrdU。

附加材料（见基本方案3）

加有或不加10μmol/L的胸腺嘧啶的组织培养基（由1mmol/L的胸腺嘧啶原液稀释，附录1），37℃。

1. 制备PHA处理的淋巴细胞培养基，并孵育。
2. 培养至次日，8：00～10：00pm，在每一个培养瓶中加入10mmol/L BrdU和10mmol/L dC，终浓度分别为100μmol/L。孵育10～12h。
3. 培养至第3日，于8：00am，将细胞和培养基转移至离心管内，180g室温离心8min，弃上清。

4. 加入 2ml 新配制的不含有 BrdU 和 dC 的组织培养基，温度为 37℃。摇动离心管使细胞沉淀重新悬浮。
5. 180g 室温离心 8min，弃上清。
6. 加入 5ml 新配制的含有 10μmol/L 的胸腺嘧啶的组织培养基，温度为 37℃。孵育 5h，使胸腺嘧啶掺入迟复制的 DNA。
7. 加入 10μg/ml 的秋水仙素，终浓度为 0.05μg/ml，孵育 30min。
8. 收获分裂中期细胞，制备染色体玻片。
9. 使 BrdU 复制的染色体显带（支持方案 3～5）。

备选方案 3　B-PULSE 成纤维细胞迟复制显带

1. 在装有活跃生长的成纤维细胞（传代约 24h 后）的培养瓶中，加入 10mmol/L BrdU 和 10mmol/L dC，终浓度分别为 100μmol/L。孵育 10～12h。如果没有得到预期的带型，可在一定的时间范围内确定最佳的周期时间（如可每次增加 1h、6～13h）。
2. 加入 10μg/ml 的秋水仙素，终浓度为 0.05μg/ml，孵育 30min。
3. 根据所培养的不同细胞，用不同的方法收获分裂中期细胞，制备染色体玻片。
4. 使 BrdU 复制的染色体显带（支持方案 3～5）。

备选方案 4　T-PULSE 成纤维细胞迟复制显带

附加材料（基本方案 3）

加有或不加有 10μmol/L 胸腺嘧啶的组织培养基（由 10mmol/L 的胸腺嘧啶原液稀释，附录 1），37℃

1. 在开始培养当日的约 5：00pm，于装有生长活跃的成纤维细胞（传代约 24h 后）的细颈瓶中加入 10mmol/L BrdU 和 10mmol/L dC 溶液，终浓度分别为 100μmol/L。孵育约 16h。如果采用推荐的孵育时间没有得到预期的带型，则应根据经验确定最佳的孵育时间（备选方案 3，第 1 步）。
2. 去除含有 BrdU 和 dC 的培养基，以新配制的 37℃、不含 BrdU 和 dC 的组织培养基洗涤细胞。加入新配制的 37℃、含有 10μmol/L 胸腺嘧啶的培养基，孵育约 6h。
3. 加入 10μg/ml 的秋水仙素，终浓度为 0.05μg/ml，孵育 30min。
4. 收获分裂中期细胞，制备染色体玻片。
5. 使 BrdU 复制的染色体显带（支持方案 3～5）。

支持方案 3　用荧光染料使 BrdU 参与复制的染色体显影

材料（标√的条目参见附录 1）

90%、70%和 30%（V/V）的乙醇
√PBS
√Hoechst 33258 染液 A
制备 BrdU 参与复制的分裂中期染色体玻片（基本方案 3 或备选方案 2～4）
√McIlvaine 缓冲液，pH7.5

配备有适合滤光片的荧光显微镜，100×Zeiss Neofluar 或 Olympus 的 S-planapo 物镜，装有胶片的相机（如 Kodak Technical Pan）

1. 准备一系列含有以下溶液的染色缸，然后按如下方法处理 BrdU 参与复制的分裂中期染色体玻片：
   分别在 90%、70%和 30%乙醇中各 2min；
   水中 2min；
   PBS 中 5min；
   Hoechst33258 染液 A 中 10min；
   PBS 中 2min；
   迅速用水冲洗 2 次（于不同的染色缸内）。
   染色后玻片避光保存，如果不是立即用玻片，应将玻片晾干。
2. 用 pH7.5 的 McIlvaine 缓冲液封片，加盖玻片。在配备有适合滤光片的荧光显微镜下观察（Hoechst 吸收 356nm 光，在 465nm 发出荧光）。
3. 在 100×的物镜下，曝光时间范围为 15～30s，以 Kodak Technical Pan 胶片在 ASA200 下立即拍照。如有需要，调整 ASA 或用更快的胶片（如 Kodak Tri-X）。如果相机有自动曝光系统，将其设置为束点曝光，将一条染色体放在光点上。
4. 避光保存玻片，以便将来再检查用，取下盖玻片，空气晾干玻片即可。再检查前可用 McIlvaine 缓冲液封片，加盖盖玻片。

支持方案 4　用光照法和吉姆萨染色使 BrdU 参与复制的染色体显影

材料（标√的条目参见附录 1）

制备 BrdU 参与复制的分裂中期染色体玻片（基本方案 3 或备选方案 2～4）
√PBS
√Hoechst 33258 染液 A 和 B
√2×SSC 溶液，60℃或 65℃
4%（V/V）吉姆萨染液（生物/医学专用或 Fisher；用之前以水溶解）
100mm×100mm×15mm 带盖的方形塑料盘
24mm×60mm 的盖玻片
20W 的荧光灯
带有绿色干扰滤光片的亮视野显微镜，装有细粒度胶片的相机（如 Kodak Technical Pan）

1. 将 BrdU 参与复制的分裂中期染色体玻片在 PBS 中预浸渍 5min，然后在 Hoechst 33258 染液 A 中浸染 10min。
2. 滴干玻片，放入 100mm×100mm×15mm 方盘内，盘底放有两张玻片或玻璃棒作为支持物。在玻片上滴加 Hoechst 33258 染液 B3 或 4 滴，盖上 24mm×60mm 的盖玻片。
3. 将方盘加盖，放在 20W 的荧光灯下，距离为 5～7.5cm，时间最少为 6h。在盘底加

一薄层 PBS，防止变干。

4. 在流动的热自来水下将盖玻片冲掉（勿撬起盖玻片）。
5. 将玻片放入预热的 2×SSC 溶液中 15min。流动水彻底冲洗。
6. 用 4%的吉姆萨染液染色 10min。
7. 水冲洗，空气晾干。
8. 亮视野显微镜下观察，加绿色干扰滤光片可拍摄黑白照片。在设置为 50～100 的 ASA 下，用细粒度胶片拍照，注意曝光时间要短。

支持方案 5　用热处理和吉姆萨染色使 BrdU 参与复制的染色体显影

此技术比光照和吉姆萨染色法简单，但效果不甚稳定。

材料（标√的条目参见附录 1）

掺有 BrdU 的分裂中期染色体玻片的制备（基本方案 3 或备选方案 2～4）
√1.0mol/L 的磷酸钠缓冲液，pH 8.0
4%（V/V）吉姆萨染液（生物/医学专用或 Fisher；用之前以水溶解）
87～90℃的热水浴
带有绿色干扰滤光片的亮视野显微镜，装有细粒度胶片的相机（如 Kodak Technical Pan）

1. 将玻片放入 pH 8.0、1.0mol/L 的磷酸钠缓冲液中，87～92℃水浴 10min。在水中晃动玻片以漂洗。
2. 在 4%的吉姆萨染液中染色 5～7min。
3. 水冲洗并空气晾干。
4. 亮视野显微镜下观察，加绿色干扰滤光片可拍摄黑白照片。在设置为 50～100 的 ASA 下，用细粒度胶片拍照，注意曝光时间要短。

基本方案 4　Distamycin-DAPI 显带（偏端霉素-二脒基苯基吲哚显带）

材料（标√的条目参见附录 1）

空气晾干的分裂中期染色体玻片（单元 4.1）
√McIlvaine 缓冲液，pH 7.0 和 pH7.5
√Distamycin A 染色液
√DAPI 染色液
镜油，弱荧光
湿盒（如装有湿纸巾的 petri 盘）
盖玻片，0 号或 1 号
配有合适滤光片和物镜的荧光显微镜（支持方案 3）

1. 于室温，将空气晾干的分裂中期染色体玻片浸入 pH 7.0 的 McIlvaine 缓冲液中 5min。滴干。
2. 将玻片放入湿盒。加 3～6 滴 Distamycin A 染色液（100～200μl），加盖玻片使染液弥漫。室温放置 10min，如有需要，减少 Distamycin A 染色液的孵育时间，以突出

DAPI 显带。

3. 在 pH 7.0 的 McIlvaine 缓冲液中简单漂洗玻片（约 10s）。于室温，用 DAPI 染色液染色 10min。然后再次用 pH 7.0 的 McIlvaine 缓冲液漂洗。
4. 用 pH 7.5 的 McIlvaine 缓冲液封片，加盖 0 号或 1 号盖玻片。
5. 在荧光显微镜下观察，用弱荧光的镜油和 Hoechst 滤光片（DAPI 吸收 355nm 光，在约 450nm 发光）。按照支持方案 3（第 3 步）进行拍照。注意不要用较快胶片拍照，以免导致带型清晰度下降。

备选方案 5　Hoechst 33258-Distanmycin 染色

附加材料（标√的条目参见附录 1）

√PBS
√Hoechst 33258 染液 A
封片缓冲液：1∶1（V/V）甘油/McIlvaine 缓冲液，pH 7.5
染色缸
喷雾器（可选）

1. 在室温将空气晾干的玻片浸入 PBS 溶液中 5min。
2. 在室温将玻片浸入含有 Hoechst 33258 染液 A 的染色缸中 12min。
3. 在 PBS 溶液中洗涤玻片 4min，然后用流水冲洗玻片 1min。如需要，可将玻片保存于带盖子的盒子中。
4. 在玻片上滴加 3 滴 Distamycin A 染色液，加盖玻片，静置 5min。用 pH 7.5 的 McIlvaine 缓冲液中漂洗玻片，可用喷雾器进行。
5. 用封片缓冲液封片，静置 2min。如前所述进行观察和拍照（支持方案 3，第 2 和 3 步）。注意不要用较快胶片拍照，以免导致带型清晰度下降。

支持方案 6　脱色

材料

已染色的玻片，未封片的或未永久封片的。
95%（V/V）乙醇
二甲苯或 Hemo-De（Fisher）
1∶1（V/V）二甲苯/乙醇（如果使用二甲苯）
固定剂：3∶1（V/V）甲醇/冰乙酸
甲醇，试剂级别

1a. 如果玻片为含水缓冲液封片：小心抬起并取下盖玻片（如果缓冲液已干，可用流动水冲洗）。如果已经浸有镜油，可直接进入第 2a 或 2b 步，如果没有可直接进入第 3 步。
1b. 如果玻片为甘油封片：在水中浸泡 2h，取下盖玻片，然后浸入乙醇中 2min，晾干。如果已经浸有镜油，可直接进入第 2a 或 2b 步，如果没有可直接进入第 3 步。
1c. 如果未封片：如果已经浸有镜油，可直接进入第 2a 和 2b 步，如果没有可直接进入

第 3 步。

2a. 如果使用二甲苯：将玻片浸泡在二甲苯中以去除油渍，然后分别用 1∶1 二甲苯/乙醇和 95%乙醇各浸泡 1min。

2b. 如果使用 Hemo-De：将玻片浸入 Hemo-De 10min。

Hemo-De 的危险性要小于二甲苯。

3. 将玻片浸入固定剂中 10min，以去除染色液。

4. 将玻片在甲醇中浸沾 1min，空气晾干。

参考文献：Latt，1976；Sahar and Latt，1980；Schweitzer，1981；Sumner，1990；Sumner and Evans，1973

编　者：Rhona R. Schreck and Christine M. Distèche

单元 4.4　中期染色体和间期核的原位杂交

细胞悬液（单元 4.1）或者贴壁细胞，如成纤维细胞（单元 8.3）和羊水细胞都可以制备成中期染色体载玻片。非同位素探针可以通过荧光和酶的方法检测（图 4.4.1 和图 4.4.2）。

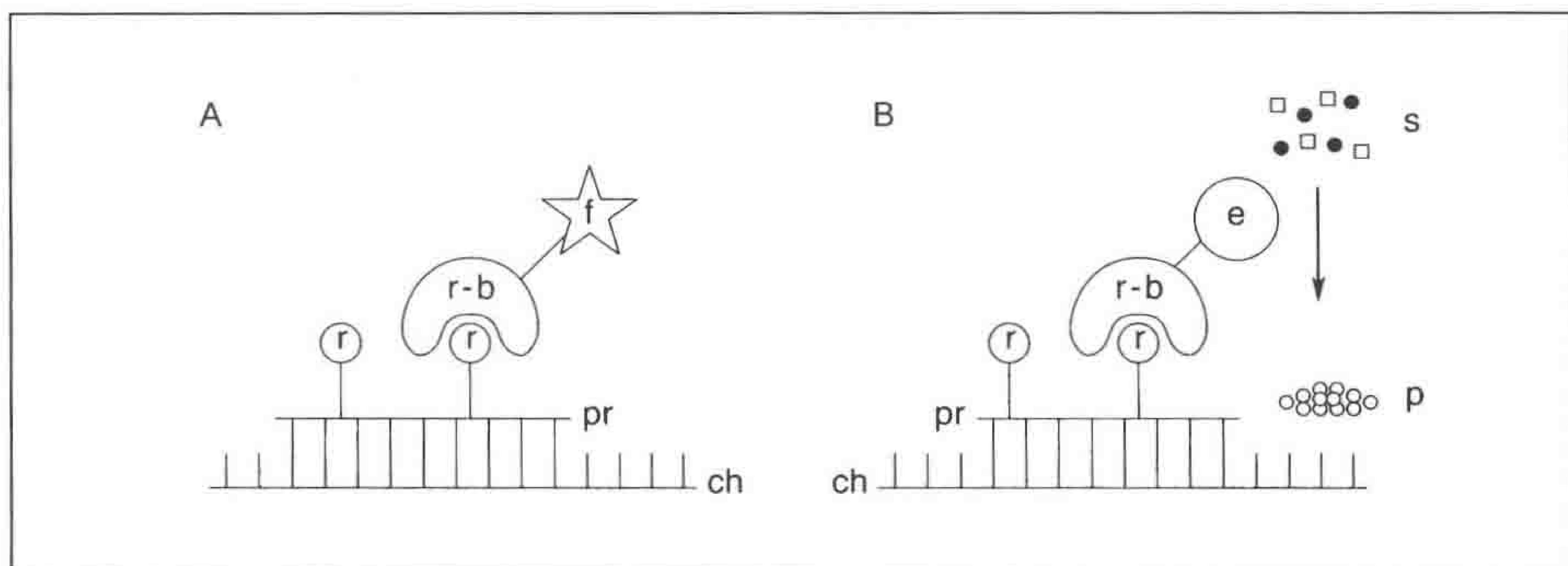


图 4.4.1　杂交探针的检测。A. 荧光原位杂交（Fluorescence in situ hybridization，FISH）。B. 酶检测。缩写：ch，染色体（chromosome）；e，酶（enzyme）（如 AP 或 HRP）；f，荧光染料（fluorochrome）（如荧光素、罗丹明、德克萨斯红）；p，有色沉淀产物（colored precipitate product）；pr，报道分子标记的探针（probe labeled with reporter molecule）；r，报道分子（reporter molecule）（如生物素、地高辛）；r-b，报道结合分子（reporter-binding molecule）（如卵白素、抗生物素蛋白链菌素、地高辛抗体）；s，可溶的酶底物（soluble substrate）。箭头表示酶的催化反应。

注意：这个实验的许多步骤需要避光操作。

基本方案　中期染色体的荧光原位杂交

材料（标√的条目参见附录 1）

含有人类中期染色体的载玻片或盖玻片（单元 4.1）

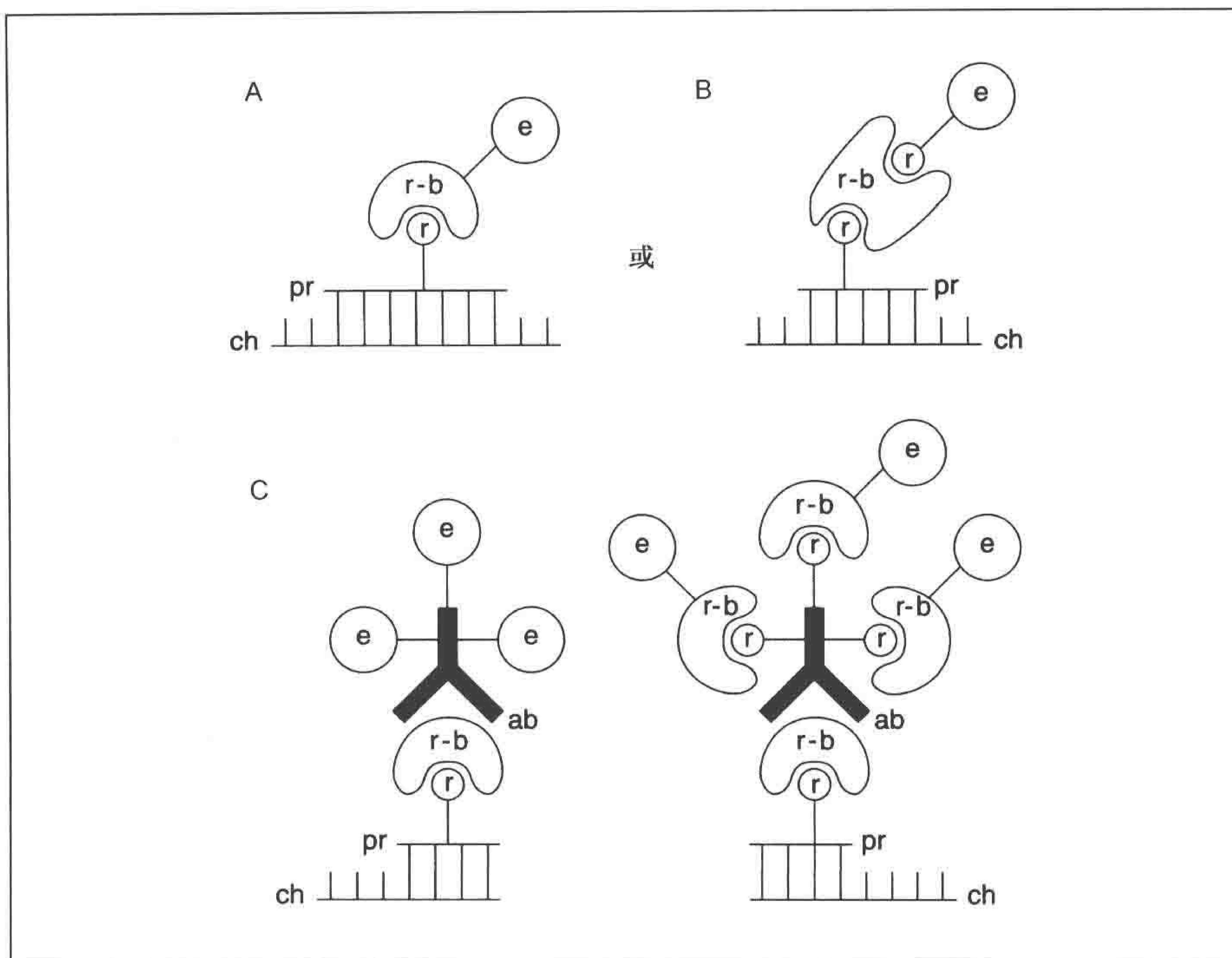


图 4.4.2　报道分子的酶检测法。A. 直接检测，酶直接结合在报道结合分子上。B. 两步间接标记法，首先报道结合分子结合在报道分子上，然后孵育使报道分子与酶结合。C. 信号放大，孵育使报道结合分子与报道结合分子抗体结合。抗体可以结合酶或报道分子。最后一幅图例，表示在添加酶底物前，酶与报道结合分子共孵育使两者结合。荧光染料和同位素可以替代酶分子。缩写：ab，结合酶或报道分子的报道结合分子抗体；ch，染色体；e，酶（如 AP 或 HRP）；pr，报道分子标记的探针；r，报道分子（如生物素、地高辛）；r-b，报道结合分子（如卵白素、抗生物素蛋白链菌素、地高辛抗体）。

变性液：70%（V/V）去离子甲酰胺/2×SSC（pH7.0），70℃（如果用于重复元件探针，试剂可以在 4℃储存 2 周，否则要新鲜配制）

70%（用冰预冷的）、80%、95%和 100%（V/V）乙醇

Cot-1 DNA（Life Technologies 公司）

非同位素标记的 DNA 探针：单拷贝的，患者染色体或重复元件探针（Oncor 或 Imagenetics 公司；支持方案 3）

√去离子甲酰胺（American Bioanalytical 公司）

√基本杂交混合液

50%（V/V）甲酰胺（非去离子的）/2×SSC

√2×、1×和 4×SSC，pH7.0

√生物素检测溶液、地高辛检测溶液或生物素/地高辛检测溶液

0.1%（V/V）Triton X-100/4×SSC

√DAPI 或碘化丙锭（propidium iodide）染色溶液

√适当的抗褪色剂

玻片染色缸
72℃、39℃、42℃水浴箱
相差显微镜
22mm² 盖玻片
橡皮泥
湿盒（图 4.4.3）
干燥的玻片盒（Baxter Scientific）
指甲油

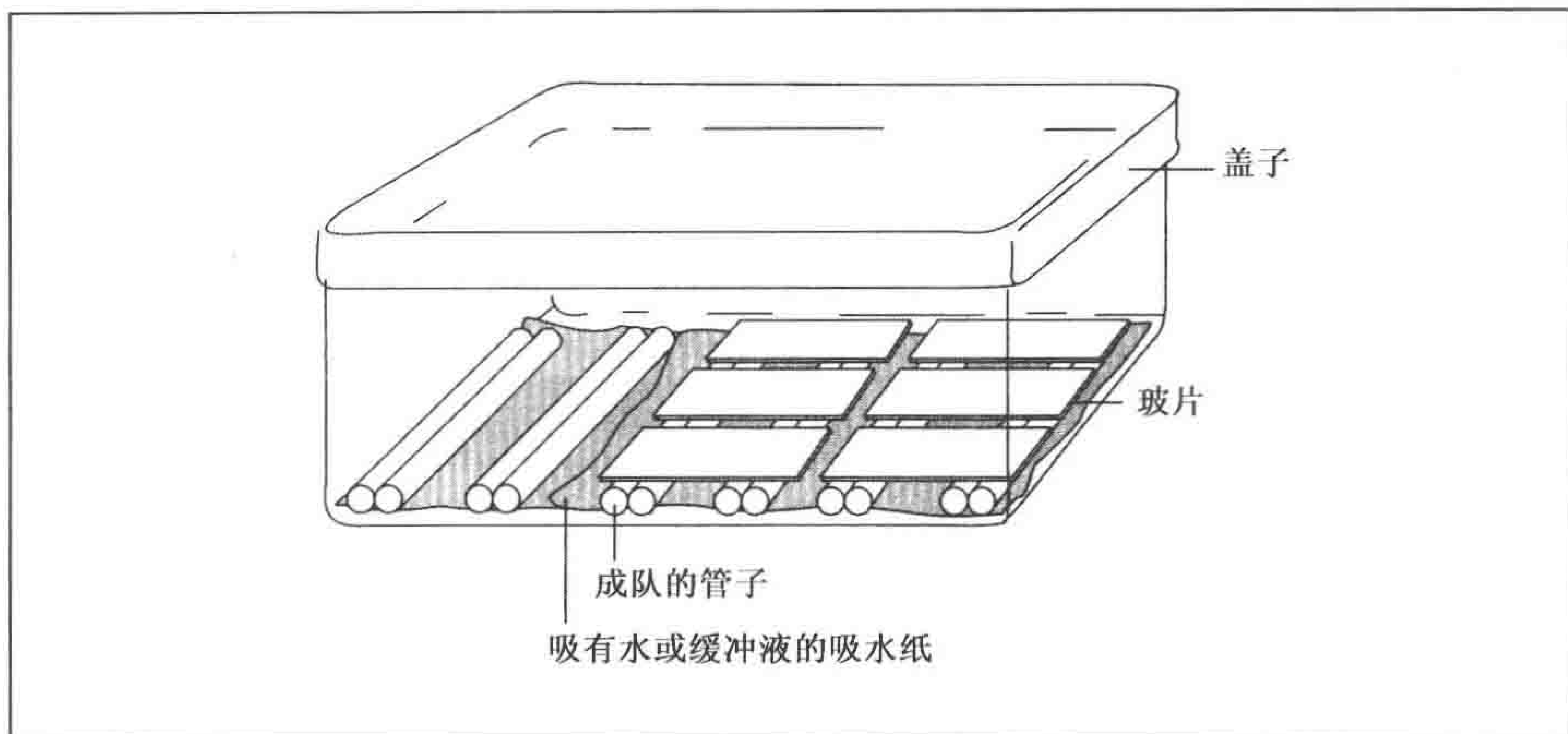


图 4.4.3 任何尺寸合适有密封盖的容器都可以做湿盒（如 Tupperware 或类似物）。把成对的 5ml 或 10ml 的管子黏在盒底作为玻片支架，管子间要间隔一段距离使两端都可以放玻片。一个不锈钢的蛋糕支架也可以作玻片支架。湿盒底要垫上吸收了水或（长时间孵育时）等渗溶液和甲酰胺溶液的吸水纸，作为杂交溶液。因为要使用光敏感试剂，所以湿盒要包上铝箔，或涂上黑色，或用黑色容器作湿盒，或者遮蔽周围的光。

落射光荧光显微镜和适用于荧光染料的滤光装置，包括双滤频（dual-band-pass）滤光器（荧光素/德克萨斯红）或三滤频（triple-band-pass）滤光器（荧光黄/德克萨斯红/DAPI；Omega Optical 或 Chroma Technology）

Ektar-1000、Ektachrome-400 或 Technical Pan 2415 胶片（Kodak）或冷光源（CCD）照相机

1. 在 72℃水浴箱中，把中期染色体的载玻片和盖玻片浸泡在染缸 70℃变性液中变性 2min（由温度计监控温度）。变性液置于水浴箱中不能超过 30min。
2. 70%的冰冻乙醇漂洗玻片 2min 终止变性。然后，室温下过 80%、95%、100%的乙醇脱水各 2min，空气干燥。
3. 用相差显微镜检查变性后的染色体标本。染色体标本应该内部结构清晰，没有中空和透明染色体。
4. 冰冻脱水 20～150ng 的非同位素标记的 DNA 探针（20ng 染色体特异性重复序列探针，50～100ng cDNA 和全染色体涂染探针，或 100～150 单拷贝基因探针，包括 YAC）。如果探针包含散在重复序列和单一序列（如在各种载体中的单拷贝基因克

隆，有散在重复和单一序列的探针、全染色体涂染探针），在冰冻脱水之前先加 10μg 人 Cot-1 DNA 以封闭重复元件。

当含有一个 YAC 的总酵母 DNA 作为探针时，要确定人类插入 DNA 在酵母 DNA 中的比例和调高 DNA 探针的总量使得杂交时人类 DNA 达到最佳浓度。

5. 将探针的离心沉淀物溶于 10μl 去离子的甲酰胺中，72℃加热 10min 变性 DNA。如果探针不需要封闭，立即置于冰上。如果探针需要封闭，置于 37℃中预退火 30min 至几个小时（长探针和有大量重复序列的探针要用更长的时间）。
6. 在变性的探针中加 10μl 基本杂交混合液。混匀，点离，滴于已变性的染色体玻片上。盖上 $22mm^2$ 盖玻片，轻轻挤压出所有的气泡，橡皮泥封片，37℃湿盒，孵育过夜（14～18h）。用着丝粒和全染色体涂染探针时，要减少孵育时间，一般少于 4h。
7. 在杂交的最后 30min 时，将盛有 50ml 50％甲酰胺/2×SSC 洗液和 50ml 2×SSC 的染缸在水浴中加热至 39℃。
8. 从湿盒中拿出玻片。揭去橡皮泥，仔细地去除盖玻片，在 39℃的 50％甲酰胺/2×SSC、39℃的 2×SSC 和室温下的 1×SSC 中洗涤杂交玻片，每次 15min。对着丝粒和全染色体涂染探针来说，要提高温度至 42℃并降低盐浓度，用 0.4×～1×SSC。
9. 玻片也可在室温下 4×SSC 中平衡 5min。洗涤间要将玻片上的水甩干。但在洗涤过程或检测的任何时间都不能让玻片干燥。
10. 加 50μl 生物素检测溶液、地高辛检测溶液或生物素/地高辛检测溶液并且覆盖 $22mm^2$ 的石蜡膜。在铝箔包裹的湿盒中 37℃孵育 45min（检测试剂和 DAPI 是光敏感的）。
11. 室温下，在铝箔包裹盛有 4×SSC、0.1％ Triton X-100/4×SSC 和 4×SSC 的染缸中，依次洗涤玻片，每次 10min。
12. 加 50μl DAPI 或碘化丙锭染液复染染色体，覆盖 $22mm^2$ 的石蜡膜，可以在室温下染 10min。快速地在 1×SSC 的染缸中漂洗去除过多的染液。吸干玻片上的水，但不能干燥。

    DAPI 可显示一种类似于 G 带的区带（单元 4.4）并且能同时观察到荧光素和罗丹明或德克萨斯红。碘化丙锭染色更均匀，能同时观察到荧光素，但是不能看到罗丹明或德克萨斯红。

13. 加 7μl 适当的抗褪色剂——如 DABCO 用于绿色荧光、*p*-苯二胺或 Vectashield 用于红色荧光（不久也可用于荧光素。）盖上盖玻片，挤出过多的抗褪色剂，指甲油封闭。－20℃储存在干燥的玻片盒中。立即检测（首选）或在 4℃或－20℃储存几个星期。
14. 用落射光荧光显微镜和与荧光染料匹配的滤片检测玻片。
15. 用 Ektar-1000（适合于打印）或 Ekatachrome-400（适合于幻灯片）彩色胶片摄像（DAPI 曝光：约 2s；双滤频滤光器：30～90s；三滤频滤光器：3～8s）。强信号时（如卫星序列，一些独特序列探针），在 ASA200 可以应用黑白胶片。此外，还可以用 CCD 相机和激光共聚焦显微镜制作数字化影像。

16a. DAPI-显带染色体：当两条染色单体均有信号时，才能在≥10 的杂交染色体上准确定位。比较 DAPI 条带染色体图像上杂交信号的位置（通过双滤频或三滤频滤

光器观察）在染色体条带上的准确定位。

16b. PI（碘化丙锭）-染色染色体：通过摄像或投影 35mm 载玻片或数字化影像来扩大杂交染色体。以 ISCN 染色体模式图（附录 2B）作为标准（Lichter *et al.*，1990），通过比较短臂末端占染色体全长的比例获得 FLPter 值。

支持方案 1　生物素化信号的放大

当背景清晰而探针只产生微弱的荧光时，可以放大信号。

附加材料（见基本方案）

4×SSC /1%（*m/V*）BSA（成分Ⅴ）中加入 1～3μg/ml 生物素化抗卵白素抗体（Vector 实验室）

生物素扩增溶液：4×SSC /1%（*m/V*）BSA（成分Ⅴ）中加入 2～5μg/ml 荧光素-卵白素 DCS（Vector Laboratories）

1. 生物素化的探针杂交玻片，洗涤，第一轮的信号检测如以上描述所示（基本方案，第 1～11 步）。
2. 如果玻片已密封，用针或手术刀去除封片物和指甲油，在盛有 0.1% Triton X-100/4×SSC 用铝箔包裹的染缸中轻轻振荡清洗玻片 15min，使盖玻片滑脱。如果盖玻片很松，仔细地揭去即可。重复洗 2 次。
3. 擦干过量的洗涤溶液，加入 50μl 1～3μg/ml 生物素化抗卵白素抗体。盖上 $22mm^2$ 的石蜡膜，置于湿盒中，用铝箔包裹湿盒，37℃孵育 30min。
4. 去掉石蜡膜，在 0.1% Triton X-100/4×SSC 中轻轻振荡清洗玻片 15min。
5. 擦干玻片上过多的水，加入 50μl 生物素扩增溶液。盖上石蜡膜，在铝箔包裹的湿盒中，37℃孵育 30min。
6. 去掉石蜡膜，在 0.1% Triton X-100/4×SSC 中轻轻振荡清洗玻片 15min，然后在 4×SSC 中清洗 15min。如果要增强信号，可以重复清洗 3～6 次（背景也会明显的增强）。
7. 如以上描述所示复染、固定、检测玻片（基本方案，第 12～16 步）。

支持方案 2　地高辛标记探针信号的放大

附加材料（见基本方案）

4×SSC /1%（*m/V*）BSA（成分Ⅴ）中加入 10μg/ml 绵羊抗地高辛（Boehringer Mannheim）Fab 片段（抗原结合片段）

地高辛扩增溶液：4×SSC /1%（*m/V*）BSA（成分Ⅴ）中加入 3.5～7.0μg/ml 荧光素结合的兔抗绵羊 IgG（Sigma）

1. 地高辛标记探针杂交玻片，洗涤（基本方案，第 1～8 步）。
2. 载玻片上滴加 50μl 10μg/ml 绵羊抗地高辛 Fab 片段，盖上 $22mm^2$ 的石蜡膜。37℃孵育 30min。
3. 去掉石蜡膜，依次在 4×SSC、0.1% Triton X-100/4×SSC、4×SSC 中洗涤玻片，

每次 15min。

4. 擦干过多的 4×SSC，在玻片上滴加 50μl 地高辛扩增溶液。盖上 $22mm^2$ 的石蜡膜，在铝箔包裹的湿盒中，37℃孵育 30min。
5. 再次洗涤，同第 3 步。
6. 如以上描述所示复染、固定、检测玻片（基本方案，第 12～16 步）。

备选方案 1 用辣根过氧化物酶进行酶检测

在原位杂交中用酶检测系统产生稳定的有颜色的沉淀，这样就提供了一个持久的信号。直接酶偶联探针首选直接法（图 4.4.2），因为酶的偶联干扰了探针的渗透。表 4.4.1 总结了用于 ISH（in situ hybridization，原位杂交）最常见的酶-底物复合体。这个方法描述了用 HRP（horseradish peroxidase，辣根过氧化物酶）检测生物素化探针。HRP 结合抗体同样可以使地高辛标记的探针显影。

表 4.4.1 检测原位杂交探针常用的酶-底物复合物

酶	底物[a]	颜色[b]
碱性磷酸酶	5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸(5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate BCIP)和硝基四唑蓝（nitro-blue tetrazolium，NBT）	紫蓝色沉淀
	Naphtol-AS-MX-phosphate 和 fast red TR	红色沉淀和红色荧光
	Naphtol-AS-MX-phosphate 和 fast blue BN（Boehringer）	蓝色沉淀
	Naphtol-AS-MX-phosphate 和 fast green BN（Boehringer）	绿色沉淀
	Vector 红	红色沉淀
	Vector 黑	黑色沉淀
	Vector 蓝	蓝色沉淀
辣根过氧化物酶	3，3-diaminobenzidine tetrahydrochloride（DAB）	褐色沉淀[c]

a. 这些试剂的主要供应厂商是 Boehringer Mannheim、Life Technologies、Promega、Sigma、Vector Laboratories，但是别的商家提供相似的试剂。b. 这栏列出了杂交信号的最终结果，一般是用传统的明视场显微镜分析结果。fast red 产生的荧光信号要用荧光显微镜分析。荧光检测的最佳方法已经被报道（Speel *et al.*，1992）。c. 能够被银沉淀增强。

附加材料（见基本方案；标√的条目见附录 1）

生物素化的杂交探针
阻断剂：1%（*m*/*V*）BSA/PBS
√抗生物素蛋白链菌素溶液
0.1%（*V*/*V*）Tween 20/PBS，42℃
√生物素化的 HRP 溶液
3% H_2O_2
DAB 酶底物溶液：500μg/ml DAB/PBS，新鲜配制
√PBS
√90%（*V*/*V*）甘油或适当的抗褪色固定剂

24mm×60mm 盖玻片

42℃水浴摇床

1. 如以上描述所示，生物素化的探针杂交染色体靶玻片，洗涤（基本方案，第 1～8 步）。
2. 从 1×SSC 中取出玻片。尽可能地擦干水，但在此过程中任何时候都不能让玻片干燥。加 200μl 阻断液，盖上 24mm×60mm 盖玻片。置于铝箔包裹的湿盒中，37℃孵育 30min。
3. 取出玻片，并倾斜使盖玻片滑落，去除多余的阻断液。加入 200μl 抗生物素蛋白链菌素溶液，盖上盖玻片，湿盒中 37℃孵育 30min。
4. 取出玻片倾斜去掉盖玻片，放入 42℃ 0.1% Tween 20/PBS 的染缸中，在 42℃的水浴摇床上摇 5min。再重复洗 2 次。
5. 去除水分。加 200μl 生物素化的 HRP 溶液，盖上盖玻片，湿盒中 37℃孵育 30min。

   第 3～5 步也可以简化为一步，即用 3μg/ml 抗生物素蛋白链菌素-HRP 结合物孵育玻片。
6. 重复第 4 步，洗涤。
7. 去除水分。加入 1/200 体积 3% H_2O_2（终浓度 0.015%）到 DAB 酶底物溶液中。立即加入 200μl DAB 酶底物溶液，盖上盖玻片，室温下避光孵育 10～20min。
8. 当肉眼可见有色沉淀时，室温下用 PBS 冲洗玻片 5min 终止反应。
9. 如果需要，用荧光复染确认染色体（基本方案第 12 步）。
10. 90%甘油或适当的抗褪色剂固定玻片（基本方案第 13 步）。用相差显微镜观察和摄像。

备选方案 2　用碱性磷酸酶进行酶检测

附加材料（见基本方案；标√的条目参见附录 1）

√生物素化的碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，AP）溶液

3μg/ml 抗生物素蛋白链菌素-AP 复合物（Life Technologies）

√碱性磷酸酶缓冲液，pH9.5，42℃

√NBT/BCIP 酶底物溶液

√PBS

√90%甘油或适当的抗褪色固定剂

24mm×60mm 盖玻片

42℃水浴摇床

1a. 多步检测：如以上描述所示，生物素化的探针杂交染色体靶玻片，洗涤，阻断，在抗生物素蛋白链菌素溶液中孵育（备选方案 1，第 1-4 步）。从 0.1% Tween 20/PBS 中取出玻片，去除水分但不能干燥。加 200μl 生物素化 AP 溶液，盖上盖玻片，湿盒中 37℃ 30min。

1b. 单步检测：杂交、洗涤、阻断，然后在 3μg/ml 抗生物素蛋白链菌素-AP 复合物中孵育。

2. 取出玻片倾斜去掉盖玻片，放入 42℃ 0.1% Tween 20/PBS 的染缸中，在 42℃的水浴摇床上摇 5min。再重复洗 2 次。
3. 将玻片放入 42℃碱性磷酸酶缓冲液中，pH9.5，42℃摇 5min。重复 1 次。
4. 将玻片放入盛有 50ml 新鲜配制 NBT/BCIP 酶底物溶液的铝箔包裹染缸中，避光放置，一般 37℃ 15～60min，或者室温下放置（慢反应）直至颜色显示清楚。
5. 室温下，PBS 冲洗玻片 5min 终止反应。
6. 如果需要，用荧光复染确认染色体（基本方案，第 12 步）。
7. 90%甘油或适当的抗褪色剂固定玻片（基本方案，第 13 步）。用相差显微镜观察和摄像。

支持方案 3　缺口平移法标记生物素和地高辛探针

应用缺口平移法（nick translation），探针不需要纯化和线性化。

材料（标√的条目参见附录 1）

缺口平移标记试剂盒（如 Boehringer Mannheim）或类似材料：
√10×缺口平移标记缓冲液
1μg 探针 DNA（如插入克隆的质粒、噬菌体、黏粒、P1 或 YAC）
1mmol/L 生物素-16-dUTP（biotin-16-dUTP）或 1mmol/L 地高辛-11-dUTP（digoxigenin-11-dUTP）（Boehringer Mannheim）
√1 和 4mg/ml DNA 酶Ⅰ（DNaseⅠ）（Worthington）
5U/ml DNA 聚合酶Ⅰ，外切核酸酶活性（Boehringer Mannheim）
√0.5mol/L EDTA
√10%（*m/V*）SDS
√10mg/ml 超声处理的鲑精 DNA
√3mol/L 乙酸钠，pH5.2
95%和 70%（*V/V*）冰冻乙醇
15℃和 65℃水浴
65℃加热阻断

1. 将 1.5ml 小离心管置于冰上，依次加入：
   10μl 10×缺口平移标记缓冲液（1×终浓度）；
   1μg 探针 DNA；
   5μl 1mmol/L 生物素-16-dUTP 或 1mmol/L 地高辛-11-dUTP（0.05mmol/L 终浓度）；
   加无菌水至 100μl 终体积；
   10μl 1μg/ml DNA 酶Ⅰ；
   4μl 5U/ml DNA 聚合酶Ⅰ。
   混匀，点离，15℃孵育 2～2.5h。
2. 从反应产物中取出 5μl 煮沸 3min 后置于冰上 2min（剩下的 95μl 保存在－20℃）。琼脂糖凝胶电泳检测探针大小（100～500bp，大部分在 250～300bp）。如果探针 DNA

的主要片段＞800bp，在反应体系中加入 5μl 4μg/ml 的 DNA 酶 Ⅰ，继续在 15℃孵育 30min，再次检测片段大小。

3. 探针片段大小合适时，在反应体系中加入 3μl 0.5mol/L EDTA 和 1μl 10% SDS，65℃加热 10min，将酶灭活。
4. 乙醇沉淀探针法：在反应体系中加入 1μl 10mg/ml 超声处理的鲑精 DNA，1/10 体积的 3mol/L 乙酸钠和 $2\frac{1}{2}$体积 95%乙醇，−20℃≥1h 或干冰上 10min。
5. 4℃，最大速度离心 30min，去上清，用 70%冰冻乙醇清洗 DNA 沉淀。空气中干燥，加入 200μl 无菌水溶解 DNA（终浓度 5ng/μl）。4℃储存（稳定性＞1 年）。如果需要（如大量应用新的 DNA 酶 Ⅰ 和 DNA 聚合酶 Ⅰ，获得的杂交信号差），检查混合液（如见 CPMB 单元 3.18）。

备选方案 3　通过间期核 FISH 排序

间期 FISH 定位可用于位于相同染色体条带的序列的排序。间期染色质比中期染色质更加松散，在中期染色体分散不佳的探针可以在间期核上排序。至少三个在间期染色质上排列 50kb～1Mb 的 DNA 探针序列有必要确定相关位置。杂交条件如上所示（基本方案）。

间期 FISH 定位是在 G_1 或 G_2 期细胞上进行，大量的这种细胞一般出现在标准的细胞学上准备收获中期染色体时期。用单个探针杂交可以看到 G_1 期细胞，每条染色体只有一个信号，G_2 期细胞每条染色体（姐妹染色单体）有两个信号。从外周血样本中收集血沉棕黄层制作 G_1 期细胞丰富的玻片，将收获的细胞低渗、固定、制作玻片（单元 4.1）。

变性、杂交、检测。用三个探针杂交同一张玻片——两个生物素标记和一个地高辛标记探针、两个地高辛标记和一个生物素标记探针，或一个生物素标记探针、一个地高辛标记探针和双重标记探针。用互补的荧光素观察信号。

一般分析 25～50 个间期细胞就可以判断顺序了。如果相邻的探针是相同的颜色（如红-红-绿），需要改变其中一个探针的颜色再杂交一次，这对确定探针顺序是必要的。这样颜色顺序就变成了红-绿-绿或绿-红-绿。如果第三个探针同时被生物素和地高辛标记，就产生了黄色荧光，红、绿、黄色信号可以直接决定顺序。如果颜色顺序不明显，有可能探针与间期核相隔很远。当两个探针间距离增加时，尤其是在 1.5～3Mb，核内染色质的缠绕非常有可能影响信号的定位。

参考文献：Lichter *et al.*，1988，1990；Pinkel *et al.*，1988

编　　者：Joan H. M. Knoll and Peter Lichter

单元 4.5　高分辨率 FISH 分析

游离染色质的 FISH 分析使定位基因间的间距≤1Mb（中期染色体 FISH 分辨率受限；单元 4.4）。

注意：除特殊情况外，所有孵育均在湿润的 37℃，5%CO_2的培育箱中进行。所有

与活细胞有关的试剂和仪器均要无菌。

基本方案 1　碱缓冲液游离染色质的制备

材料（标√的条目参见附录 1）

培养的成纤维细胞或 10ml 新鲜人外周血或脐带血
√成纤维细胞或淋巴细胞培养基
胰蛋白酶/EDTA 溶液（Life Technologies）
√碱缓冲液
固定剂：3∶1（*V/V*）甲醇/冰乙酸（新鲜配制）
60mm 组织培养皿
$25cm^2$ 组织培养瓶
15ml 螺口聚苯乙烯试管
显微镜玻片，冰上预冷 5～10min
相差显微镜
玻片盒

1. 确定细胞用碱处理的最佳时间（支持方案 1）。

为了阻止染色质纤维聚合仅有一部分细胞要达到游离状态。有聚合的玻片不能用于 FISH 定位。如果必要，除处理时间外，细胞数目也要调整（第 4a 和 3b 步）。

成纤维细胞（贴壁培养）

2a. 在 60mm 培养瓶中培育成纤维细胞，培养液中含有血清，培养至细胞融合。需要的话，原代培养 2～4d，融合前使 G_1 细胞丰富，这样的杂交模式比 G_2 细胞更简便。

3a. 用无血清成纤维细胞培养基冲洗培养皿。每个 60mm 培养皿中，加入 1ml 胰蛋白酶/EDTA溶液。37℃ 30～60s。当细胞开始从培养皿壁脱离时，加入 1ml 含血清的纤维母细胞培养基终止胰酶消化。避免过长时间的胰酶消化。

4a. 在 15ml 培养管中快速分成 5～10 份，每份 0.2～0.4ml（约 10^4 个细胞）。

淋巴细胞（悬浮培养）

2b. 室温 10*g* 低速离心 5min 或单离心力沉降，分离外周血或脐带血淋巴细胞。在 $25cm^2$ 组织培养瓶中加入 0.5～0.8ml 淋巴细胞（10^5～10^6 个细胞），培养瓶中有 20ml 含血清的淋巴细胞培养基。培养 48h。可能的话，加入终浓度为 0.3mg/ml 的胸腺嘧啶，培养 16～18h 使细胞在 G_1 期同步。用含血清的淋巴细胞培养基清洗胸腺嘧啶处理的细胞，再培养 10h。

3b. 把细胞悬液分成 4ml 一份（约 10^4 个细胞）放入 15ml 螺口聚苯乙烯试管中。室温 180*g* 离心 7min。

4b. 在 0.3ml 含血清淋巴细胞培养基中使细胞再悬浮。

5. 加入 2ml 碱缓冲液，轻轻振荡混匀，室温放置 2～10min（第 1 步）。

6. 每管加入 3ml 固定液终止碱的反应。轻轻混匀，180*g* 离心 7min，收集游离染色质。

7. 在4ml新鲜固定剂中使沉淀悬浮，室温孵育10min。再次离心。
8. 在0.2ml固定剂中轻轻振荡混匀沉淀，在预冷的玻片上滴上游离染色质悬液。前后晃动玻片，快速空气干燥。
9. 用相差显微镜观察玻片检测样本质量，得到高质量样本（每100×视野2～10个游离染色质结构）。可以适当地调整细胞数目和处理时间。
10. 根据最佳条件制备其余的玻片。为方便比较，在同一张玻片上制备游离染色质和中期染色体铺片。室温下干燥质量好的玻片1d，放入玻片盒中用蜡膜封好（避免脱水，脱水会不可逆地损坏游离染色质结构），−20℃储存几个月。

支持方案1　游离染色质标本的优化

不同类型的细胞，通过调整时间长短可以确定碱处理持续的最佳时间。使三个因素中的两个因素不变，调整可变因素来确定最佳pH（10～11）和KCl浓度（通常0.4%～1% *m/V*）。正常情况下，彻底的确定最佳KCl浓度和pH是不必要的，因为这很容易控制。

附加材料（见基本方案1）

4%吉姆萨染液：2ml吉姆萨染料（Fisher）/48ml Gurr，pH6.8（BDH），新鲜配制

1. 将准备用FISH分析的约5×10^4个成纤维细胞和淋巴细胞进行基本方案1中的第2a～4a或2b～4b步。
2. 准备5个15ml试管装上2ml碱缓冲液。将0.2～0.4ml新鲜细胞悬液（约10^4个细胞）滴入每个试管，轻轻摇晃混匀。
3. 分别在2、4、6、8、10min时，加入3ml固定液到不同的试管中，立即混匀终止反应。
4. 室温下180*g*离心7min。在3ml新鲜固定液中再悬浮，室温下5min。离心，在0.3ml新鲜固定液中悬浮，彻底混匀。
5. 将每份悬液滴1滴在预冷的玻片上。前后晃动玻片快速空气干燥。室温下，4%吉姆萨染液染5min。
6. 用显微镜观察每张玻片确定游离染色质结构的质量，染色质应该类似长梭形或绳索结构，有光滑的边缘，尽可能少的缠绕（接触处）。确定碱缓冲液处理的最佳持续时间。如果游离染色质很少，延长处理时间。如果缠绕严重，减少处理时间。

备选方案　药物处理的淋巴细胞游离染色质的制备

虽然用碱性缓冲液制备游离染色质很简便，但是药物处理淋巴细胞似乎产生更稳定的结果，游离染色质的形态更均一。

附加材料（见基本方案1）

10ml新鲜人类外周血或脐带血

√5mg/ml m-AMSA，10mg/ml溴化乙锭，或BrdU和2′-脱氧胞苷酸

0.4%（*m/V*）KCl

4%吉姆萨染液：2ml 吉姆萨染料（Fisher）/48ml Gurr，pH6.8（BDH），新鲜配制

注意：m-AMSA 和溴化乙锭是诱变剂，要仔细处理。

1. 室温 10*g* 低速离心 5min 或单离心力沉降，分离外周血或脐带血淋巴细胞。
2. 在 25cm^{2}组织培养瓶中加入 20ml 含血清的淋巴细胞培养基，并吸入 0.5～0.8ml 分离的淋巴细胞。培养 50h。
3. 加入 40μl 5mg/ml m-AMSA（终浓度 10μg/ml）、20μl 10mg/ml 溴化乙锭（终浓度 10μg/ml），或 100μmol/L 2′-脱氧胞苷酸（终浓度）。培养 2h。

   必要的话，在培养约 46h 时（第 2 步）用少量培基检测药物浓度（如 5、10 和 20μg/ml m-AMSA）。用不同药物浓度培养 2h 后，做第 4～9 步确定哪种药物浓度产生最佳游离染色质。在培养 50h 时（第 3 步），用最优药物浓度处理余下的培养基。最佳方案不是必需的。
4. 吸取至少 4ml 的培养液（约 10^{4}个细胞）到 15ml 螺口聚苯乙烯试管。室温下，180*g* 离心 7min，收集药物处理的细胞。
5. 去上清，加入 0.3ml 含血清的淋巴细胞培养基，混匀。加入 5ml 0.4% KCl 溶液，混匀。37℃，培养 10min（如果游离染色质产量低，培养 20～30min）。
6. 加入 0.1～0.2ml 新鲜配制的固定液。轻轻混匀，再次离心。
7. 去上清，加入少量几滴新鲜固定液，轻轻振荡管底使沉淀松散。加入 5ml 固定液，混匀，室温下培养 20min。
8. 再次离心，去上清，加入 0.5ml 新鲜固定液，混匀。
9. 在预冷的玻片上滴 2 滴游离染色质悬液。前后晃动玻片快速空气干燥。用相差显微镜检测。或者室温下 4%吉姆萨染液染 5min，明视场显微镜检测。保存好的样本（每 100×视野 2～10 条游离染色质）。如果游离染色质的密度不佳，增加或减少固定液。
10. 用最佳条件制备其他的玻片（基本方案 1，第 10 步）。

基本方案 2　用游离染色质进行高分辨 FISH 定位

材料

游离染色质玻片标本（基本方案或备选方案）

变性溶液：70%去离子的甲酰胺（附录 1）/2×SSC（pH7.0；附录 1），70℃

55℃温箱

70℃水浴箱

Ektachrome P1600 胶片（Kodak；高速胶片）

1. 将游离染色质玻片标本 55℃烤 2h。
2. 然后放入 70℃变性中变性 3～4min。
3. 参照中期染色体 FISH 所描述的方法（单元 4.4）进行探针变性和与游离染色质杂交，黏粒或噬菌体探针扩增信号（YAC 探针和重复序列探针可以选择性的扩增信

号；应用 CCD 相机时不必扩增信号）。

4. 用装备落射光和双滤光片（FITC/德克萨斯红）或三滤光片（FITC/德克萨斯红/DAPI）的显微镜检测玻片。用 Ektachrome P1600 胶片和 ASA 3200 曝光设置拍摄玻片。

基本方案 3　用于直接可视性杂交定位的伸展的细胞 DNA 制备

伸展的 DNA 去掉了染色质的蛋白质，缺乏核结构。用伸展的 DNA 进行直接可视性杂交（direct visual hybridization，DIRVISH）定位可以提高分辨率并且可以直接看到线性的信号结果。

材料（标√的条目参见附录 1）

培养的细胞（或者别的适合的细胞）
√PBS
√溶解缓冲液
固定液：3∶1（*V*/*V*）甲醇/冰乙酸（新鲜配制）
氮气
25mm×75mm×1mm 显微镜玻片
湿盒（图 4.4.3）
隔热袋
干燥用无水硫酸，8mesh（Fisher）

1. 收获细胞，加入 PBS 调整细胞悬液浓度使 2μl 中有 100～5000 个细胞（5×10^4～2.5×10^6 个细胞/ml）。
2. 滴加 2μl 细胞悬液于 25mm×75mm×1mm 玻片的一端，空气干燥。
3. 加 5～8μl 溶解缓冲液于干燥的玻片上，室温下，湿盒中孵育 5min。
4. 轻轻地倾斜玻片到垂直位置，使 DNA 的一端处于上方。让 DNA 慢慢流向玻片的另一端，空气干燥。
5. 玻片干燥时立即滴加 400μl 固定液覆盖，放置 1min。
6. 倾斜玻片流走多余的固定液。空气中自然干燥。用蚀刻笔标记有 DNA 的区域确定感兴趣的范围。
7. 将玻片置于装有氮气的隔热袋中，－20℃储存。里面放置干燥用无水硫酸（存放＞1 年）。

基本方案 4　使用伸展 DNA 的高分辨直接可视性杂交定位

直接可视性杂交（DIRVISH）可以定位相邻位置为 1kb 的两个或多个探针。前面提到的一些有关相邻位置探针的内容在这个基本方案中同样需要，即与 FISH 分析中期染色体或间期核的内容紧密联系。把一个已知片段大小的探针作为内对照。当只要确定探针的顺序或估计探针间间隔或重叠的距离时，没有内对照也可以。

以下的组合给出了最好的直接可视性杂交结果：生物素检测荧光素连接的卵白素（绿色）、地高辛检测罗丹明连接的抗地高辛（红色；或德克萨斯红）、等份混合生物素

和地高辛（黄色）。在标记反应中，可以通过调整生物素-dUTP 和地高辛-dUTP 的比例产生其他的颜色（如 3 份地高辛和 1 份生物素混合得到橘色）。颜色数目增加时，需要有相应的影像处理系统客观地分析颜色。

材料（标√的条目参见附录 1）

100μg/ml RNA 酶：2mg/ml 去 DNA 酶的 RNA 酶（附录 1）/2×SSC；新鲜配制
含有延伸 DNA 纤维的玻片（基本方案 3）
√4×SSC 和 2×SSC
70%（V/V）去离子甲酰胺（附录 1）/2×SSC，70℃
70%（V/V）冰冻乙醇
100%和 90%（V/V）乙醇，室温
标记的探针（支持方案 2）
超声处理的基因组 DNA（100～1000bp；附表 1）或 C_0t_1 DNA（Life Technologies）
√杂交混合液
封片胶
50%（V/V）未去离子的甲酰胺/2×SSC
√卵白素前体阻断液
5μg/ml 荧光素-卵白素 DN（Vector）加入 4×SSC 中/1%（m/V）BSA
4×SSC/0.1%（V/V）Triton X-100
PN 缓冲液
NGS/PN 溶液：4%（V/V）普通山羊血清（NGS，Vector）加入 PN 缓冲液中（每份 1ml 存储在 4℃）
5μg/ml 生物素化的抗卵白素 D 抗体（Vector）加入 NGS/PN 溶液
10μg/ml 鼠抗地高辛抗体（Boehringer Mannheim）加入 NGS/PN 溶液
10μg/ml 地高辛标记的多价抗鼠 IgF $(ab')_2$ 片段（Boehringer Mannheim）加入 NGS/PN 溶液
25μg/ml 罗丹明连接的抗地高辛 Fab 片段（Boehringer Mannheim）加入 NGS/PN 溶液
Vectashield 抗淬灭固定剂（Vector）
核酸染料（如 1μg/ml DAPI；任选）
22mm×40mm 盖玻片，no. 1
聚乙烯染缸
湿盒（图 4.4.3）
45℃和 70℃水浴箱
封片胶
落射荧光显微镜、三色滤光片（DAPI、荧光素、德克萨斯红或罗丹明）及 100×油镜，N. A. 1.4（如 PlanApo、Nikon）
Ektachrome ASA 400 幻灯胶片（Kodak）或数字影像系统（如 Oncor VI 50）和适合的软件

10μm 分割标度的镜台测微尺

1. 在玻片上包含伸展 DNA 纤维的区域滴上 50μl 100μg/ml RNA 酶。盖上 22mm×40mm no. 1 盖玻片，湿盒中 37℃孵育 1h。
2. 在 5 个染缸中分别加入 2×SSC、70%甲酰胺/2×SSC，以及 70%、90%和 100%乙醇。SSC 和甲酰胺/SSC 加热到 70℃；70%的乙醇染缸置于冰上或者加入－20℃的冰冻乙醇。90%和 100%的乙醇置于室温下。
3. 轻轻地倾斜玻片使盖玻片滑落至边缘，揭起盖玻片。立即将玻片浸入 70℃ 2×SSC 中。
4. 将玻片浸入 70℃ 70%甲酰胺/2×SSC 中，2min，慢慢地晃动玻片。
5. 快速地将玻片放入 70%冰冻乙醇中脱水 1min，轻轻晃动玻片。随后，在室温下的 90%和 100%乙醇中脱水。空气干燥。
6. 在 1.5ml 的离心管中将每个标记探针（黏粒或小探针 20ng；YAC 或其他大探针 200ng）与 10μg 的超声处理的 gDNA 或 C_0t_1 DNA 充分混匀。将多色探针放在同样的管子内。真空离心蒸发浓缩器中干燥。
7. 加入 2μl 去离子水重新悬浮沉淀并混匀。加入 8μl 杂交混合液，混匀。70℃，探针变性 5min，然后置于冰上。
8. 在玻片上包含伸展 DNA 纤维的区域加上探针，盖上 22mm×40mm 盖玻片，用镊子轻轻压紧排出气泡，用封片胶封片，湿盒中 37℃过夜（约 18h）。
9. 在两个染缸中装 40ml 50%甲酰胺/2×SSC，两个染缸中装 40ml 2×SSC，加热到 45℃。
10. 从湿盒中取出玻片。用镊子揭去封片胶并掀去盖玻片。将玻片在每个甲酰胺 2×SSC 染缸中浸泡 3min，2×SSC 染缸中浸泡 2min。必要时，玻片可以在室温 4×SSC 中储存至少 3h。
11. 取出玻片，尽量甩干溶液。但操作过程中不能使玻片干燥。
12. 加 50μl 卵白素前体阻断液。盖上 22mm×40mm 盖玻片，避免产生气泡。湿盒中，室温下孵育 10min。
13. 小心去掉盖玻片。加 25μl 的 5μg/ml 荧光素-卵白素 DN 并盖上盖玻片。湿盒中，室温下孵育 20min。
14. 小心去掉盖玻片。室温下，玻片依次在 4×SSC、4×SSC/0.1% Triton X-100、4×SSC 和 PN 缓冲液中浸泡 2min。
15. 信号倍增：加 50μl NGS/PN 缓冲液，盖上盖玻片。室温下湿盒中孵育 10min。
16. 去掉盖玻片。在玻片上包含伸展 DNA 纤维的区域加上 25μl 的 5μg/ml 生物素化的抗卵白素 D 抗体，盖上盖玻片。室温下湿盒中孵育 20min。
17. 如第 14 步洗涤玻片。然后重复第 12～15 步荧光素检测生物素。
18. 去掉盖玻片。加 25μl 的 10μg/ml 鼠抗地高辛抗体，盖上盖玻片。室温下湿盒中孵育 20min。
19. 重复第 14 和 15 步。
20. 去掉盖玻片。加 25μl 的 10μg/ml 地高辛标记的多价抗鼠 IgF $(ab')_2$ 片段，盖上盖玻片。室温下湿盒中孵育 20min。

21. 重复第 14 和 15 步。
22. 去掉盖玻片。加 25μl 的 25μg/ml 罗丹明连接的抗地高辛 Fab 片段，盖上盖玻片。室温下湿盒中孵育 20min。
23. 重复第 14 步。
24. 加 10μl 的 Vectashield 抗淬灭固定剂，盖上 22mm×40mm 盖玻片。用镊子轻轻压紧盖玻片排出过多的固定剂。如果需要，加一个核酸染料到可见的 DNA 纤维上，如 1μg/ml DAPI。
25. 使用适合的滤光片（如同时检测 DAPI、荧光素、罗丹明的三色滤光片）及 100×油镜，N. A. 1. 4 在落射显微镜下观察玻片。设置好焦距和扫描视野，在细胞溶解的位置开始观察信号并逐渐移到玻片的另一端。避光 4℃保存若干天。
26. 用 Ektachrome ASA 400 胶片记录玻片图像，把握好曝光的时间（如三色滤光片 15～60s）。也可以用数字信号系统分析记录图像。

    Oncor 系统包括的软件可以分析每个信号的大致长度并产生图像。

27. 选取信号显示为相关探针位置精确定位的图像（图像缺少一个或多个信号的不能提供精确的数据）。必要的话（如分析重排时），统计分析数据。
28. 计算有色探针特异性信号始端和末端间的距离，提供直接可视信号的合理精确长度。计算一个信号的末端到下一个信号始端间的距离（如在数字化的图像上或用尺子量出玻片摄影图像上的距离）。
29. 辨别两探针间的重叠区域——颜色均匀的区域，即使是两种探针颜色混合在一起时。三种探针时，就需要用两种颜色的探针重复实验。
30. 根据参考探针距离标准化所有距离。

    假定 DNA 延伸是均匀的，几乎不能再伸长时，参考探针作为 DNA 延伸程度的内对照（如果一个 40kb 的黏粒探针信号是 10μm，那么这个探针和下个探针之间 5μm 的距离就代表 20kb）。

31. 在至少 10 张图像中平均标准化后的距离，将探针精确定位。当确定 DNA 延伸程度时，拍摄一个 10μm 分割标度的镜台测微尺用于校准计算的绝对长度。

支持方案 2　生物素和地高辛标记的直接可视性杂交探针

用随机寡核苷酸引物标记的探针不能用于直接可视性杂交，因为这种方法很难控制标记片段和模板 DNA 的长度，同时模板 DNA 保持完全未被标记。

材料（标√的条目参见附录 1）

√缺口平移标记缓冲液

DNA 被标记作为直接可视性杂交探针

1mmol/L 生物素-16-dUTP 或地高辛-11-dUTP（Boehringer Mannheim）

√DNA 酶 I 工作溶液

10Ci/ml [α-^{32}P] dCTP（3000Ci/mmol；Du Pont NEN）

5U/ml DNA 聚合酶 I （Promega）

10×阻断 NT 缓冲液：0.5%（*m*/*V*）SDS/0.25mol/L EDTA，pH8.0

√葡聚糖凝胶 G-50

0.25%（*m*/*V*）溴酚蓝（室温保存）

√生物凝胶 P-60

2%（*m*/*V*）琼脂糖微型胶，≤0.5mm 厚

100～1000bp DNA 分子长度标记（molecular size marker）

14℃和 100℃水浴箱

1cc 结核菌素注射器

玻璃丝

9in（22cm）巴氏吸管

隔热袋

1. 在 1.5ml 离心管中加入以下试剂（总体积 100μl）：

   10μl 缺口平移标记缓冲液；

   2μg 被标记的 DNA；

   3μl 1mmol/L 生物素-16-dUTP 或 1mmol/L 地高辛-11-Dutp（或每样 1.5μl）；

   加 H_2O 到 93.8μl；

   4μl DNA 酶Ⅰ工作溶液；

   0.2μl 10Ci/ml [α-^{32}P] dCTP；

   2μl 5U/ml DNA 聚合酶Ⅰ。

   弹击试管充分混合各成分。14℃孵育 2～4h。

2. 加入 10μl 10×阻断 NT 缓冲液，37℃孵育 5min 终止反应。需要时，将样本储存在 −20℃。

3. 取出 2μl 样（1/50 体积）放入微离心管中作为“前”样品用以确定混合百分比（第 8 步）。

生物素标记的探针

4a. 用玻璃丝填塞住 1cc 结核菌素注射器狭窄的末端。注射器顶端填满葡聚糖凝胶 G-50，并放置于 15ml 离心管内。

5a. 约 300*g* 离心 10s，室温。将注射器放入一个新的 15ml 离心管内。

6a. 在被标记的 DNA 里加入 1μl 0.25% 溴酚蓝（迁移的位置与单一的核苷酸相同），并移入胶柱的顶端。再次离心。

7a. 用盖革计数器检测流出物，确定其包含^{32}P（即标记的 DNA）。如果 DNA 没有流出，用 100μl 水冲洗葡聚糖凝胶，再次离心。

地高辛和双标记探针

4b. 用玻璃丝填塞住 9in 巴氏吸管的末端。用生物凝胶 P-60 填塞巴氏管，从顶端到约 1in 填满。将巴氏管放入 15ml 离心管中。地高辛标记的探针不能使用葡聚糖凝胶旋转柱。

5b. 当水平面刚好达到胶的顶端时，在标记 DNA 里加入 1μl 0.25% 溴酚蓝，移入胶柱

的顶端。样品进入胶后，加约 100μl 水推动样品流过胶柱。

6b. 继续加水使探针流出胶柱，用盖革计数器检测放射性。当第一个峰（混合核苷酸）即将出现时（计数开始增加时），小心地将胶柱移至 1.5ml 离心管中，收集样品直至峰离开胶柱（计数已降至水平）。

7b. 收集的探针里含有大量的水，用真空离心蒸发浓缩器干燥部分探针，并加水重新悬浮探针沉淀。

8. 从探针溶液中取出 1/50 体积作为“后”样品，放入微离心管中。在闪烁计数器中计算前样和后样以确定混合百分比（必须有 10%～20%能实现连续的信号串）。

9. 取出小份探针溶液，100℃加热 3min 变性。2%（*m*/*V*）琼脂糖微型凝胶电泳，用 100～1000bp DNA marker 标记。溴化乙锭染色。摄像时将 marker 靠近标尺。

10. 稍微把胶吸干，密封在隔热袋中，放入有 X 线胶片的暗盒内。放射自显影 6h 或根据需要延长时间。可以在反应初期使用更多的^{32}P 示踪剂来减少曝光时间。放射自显影时，胶仍然要放在水中。使用≤0.5cm 厚的胶以适合胶片暗盒的大小。

11. 使用的探针为 100～1000bp，平均为 500～1000bp，最大为 1500bp（标准 FISH 探针 100～500bp 的范围也适用）。如果探针不是最佳长度，调整 DNA 酶 I 得到合适大小的片段。－20℃储存（至少可以保存一年）。

参考文献：Heng and Tsui，1994；Parra and Windle，1993

编　　者：Henry H. Q. Heng，Lap-Chee Tsui，Bradford Windle，and Irma Parra

单元 4.6　多色荧光原位杂交（FISH）方法分析人类完全基因组

染色体特异性涂染探针的制备和组合标记

大部分多色 FISH 方法的基础是染色体特异性染料的使用——DNA 探针定位于特异性的条带覆盖了整条给定的染色体。尽管体细胞杂交 DNA 和显微切割染色体等可以作为涂染探针，但目前来说染色体流动分选成为获得稳定精确的染色体模板 DNA 的最佳选择方法。在双变量染色体流动分选中，中期染色体样本被染上色霉素（chromomycin）A3（染 GC 富集区域）和烟酸己可碱 33258（Hoechst 33258）（染 AT 富集区）。然后染色体样本通过装备有两个 5W 氩离子激光器的荧光激活细胞分选仪。一个激光器设置为激发 Hoechst（300mW，351～364nm），另一个设置为激发 chromomycin（300mW，458nm）。一个集成的计算机系统收集大数量染色体的相关荧光测量，并且绘制图形产生一个特征性的流动核型图（图 4.6.1）。包含染色体的液流被打断成一系列的微小的点，如一些液滴仅包含一条染色体。运用电荷分选感兴趣的染色体液滴。当只含一条染色体的液滴通过两高压极板之间时，它们会偏向一边的干净微离心管中。收集 300～500 条染色体，进行两轮简并寡核苷酸引物（DOP）PCR 。第一轮用未标记的 dNTP 扩增染色体 DNA，第二轮扩增应用半抗原化或荧光染料结合的核苷酸（如生物素-14-dATP 或荧光绿-11-dUTP）。一般，未标记的人类 Cot-1 DNA 也加入涂染探针混

合液中抑制高度重复 DNA 的杂交，虽然在一定环境下，探针的自身退火也可以抑制高度重复 DNA 的杂交。

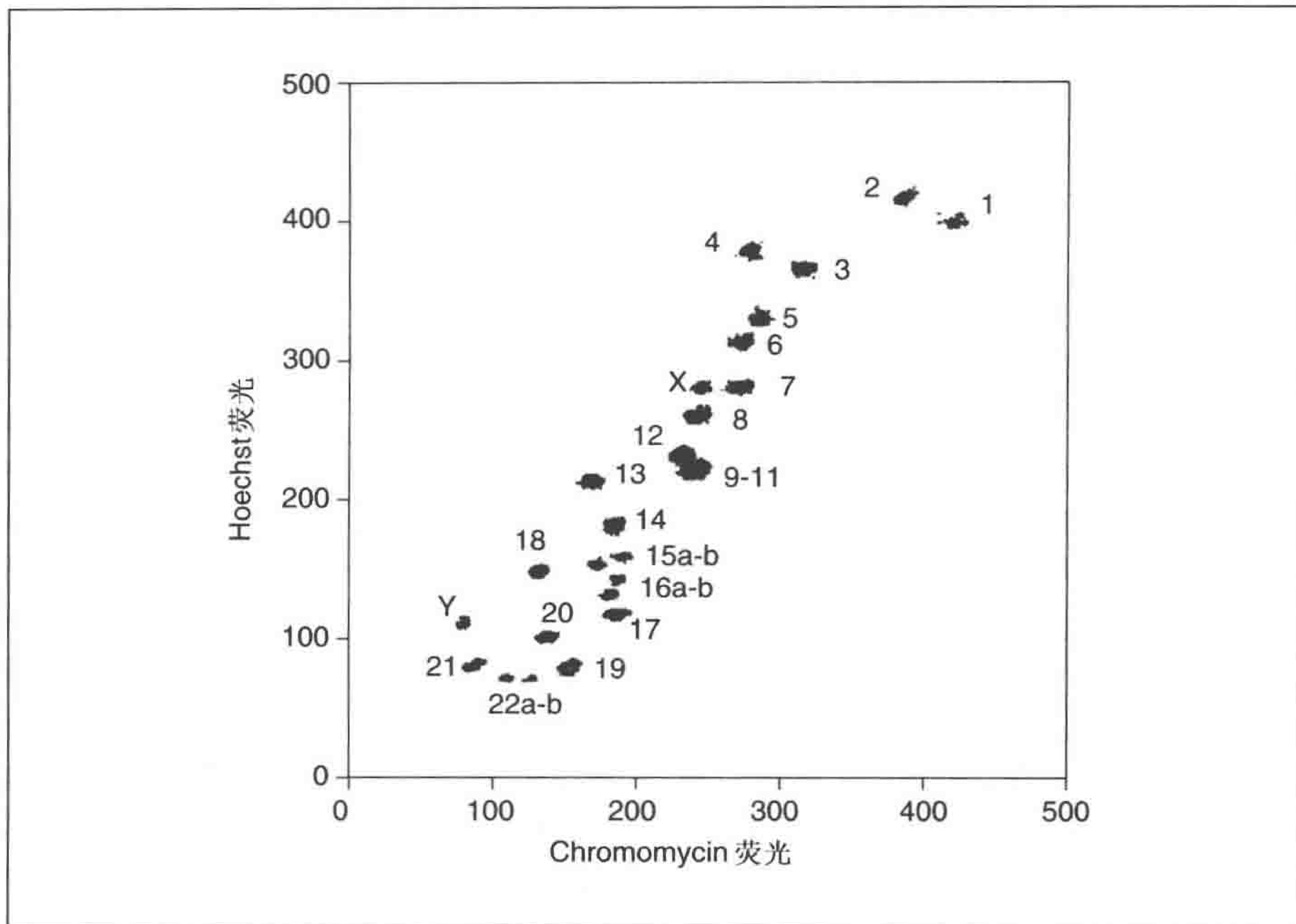


图 4.6.1　用 Hoechst 33258 和 chromomycin A3 染色的正常男性染色体悬液通过荧光激活细胞分选仪产生双变量人类流动核型图。此图所示，通过长度和碱基对构成不能分辨 9～11 号染色体。15、16 及 22 号染色体被分成了两个同源物。P. C. M. O'Brien 提供。

应用人类染色体涂染探针同时分析完全基因组，要求每条人类染色体可以通过颜色辨别区分。当没有足够多的不同光谱的荧光染料标记所有 24 条染色体时，标记策略是使用仅有的荧光染料颜色区分每条人类染色体。其中一个标记策略是通过混合荧光染料的不同比率来区分目标（即两荧光的比率可调整为 75∶25、50∶50 或 25∶75）；然而，由于荧光染料的比率难于稳定的控制，这个策略不能常规用于早期大规模商业探针的生产。更加广泛应用的标记方法是组合方案，不同的荧光染料组合应用，常是等摩尔量混合。组合标记方案的变换次数通过公式 2^n-1 计算，n 代表荧光染料的个数。在这种方法中，所有人类 24 条染色体仅用 5 种荧光染料标记就可以区分。实际上，用这相同的 5 种荧光染料可以标记和区分 31 条染色体。

SKY 与 M-FISH

当所有人类染色体用组合方案分别标记并混合在一起时，结果是产生了一个 24 种颜色的探针集。用这套探针与给定的中期核型杂交可以用不同的色彩检测到每条人类染色体。当有相同半抗原的发射光谱在 480～700nm（图 4.6.2）聚集和部分重叠时，调节荧光显微镜和使用特定的软件识别每条染色体的组合色。光谱核型分析（spectral karyotyping，SKY；Schröck *et al.*，1996）和多色 FISH（multifluor/multiplex FISH，M-FISH；Speicher *et al.*，1996）是实现这些功能的两个系统。

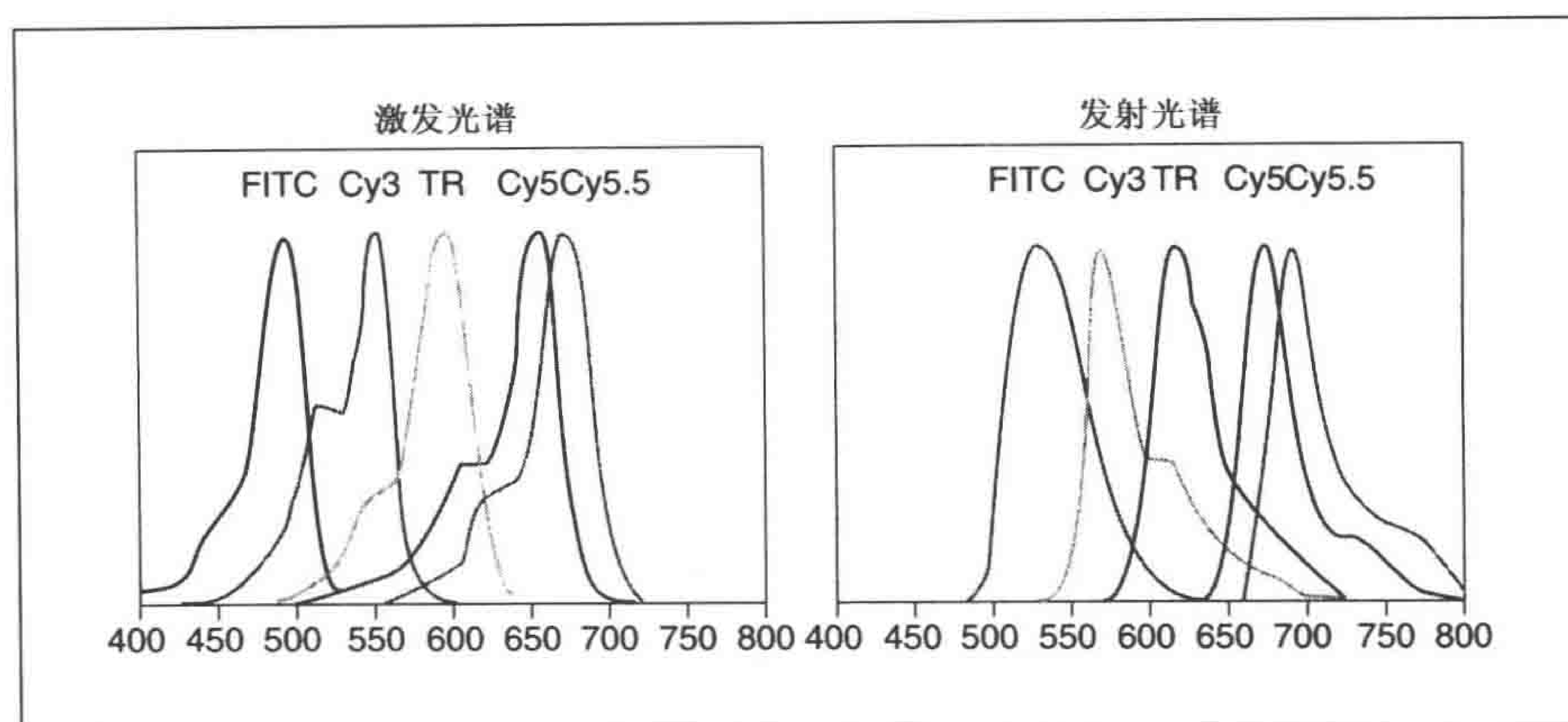


图 4.6.2　在多色 FISH 实验中 5 种同时使用的荧光染料的吸收和发射光谱。x 轴表示波长（nm），y 轴表示荧光强度（任意单位）。异硫氰酸荧光素（FITC）、Cy2 和绿色光谱共有相似的光谱。Cy3、橘色光谱和罗丹明有相似光谱。德克萨斯红（TR）、Cy3.5 和红色光谱相似。Cy5 和深红有相似光谱。

使用 SKY 系统，荧光通过三滤频的选色镜同时激发和检测所有荧光染料。从样本发射的荧光通过干扰仪时被分成了两束。有光学路径差的两束光重新组合在一起，这样使它们之间相互干扰。傅里叶变换转换干扰器发出的信息，生成的完全光谱投射到集成 CCD 相机上成为像点。然后，每个像点的光谱比较用于试验的 5 种荧光染料的光谱以确定荧光染料组合所产生的独特光谱。一旦确定了荧光染料组合色，根据已知的探针标记方案（图 4.6.3）就可以知道相关染色体的来源了。中期铺片的光谱图可以加上伪色进行核型分类，从而最大限度地分辨染色体。

标记	人类染色体																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
FITC	■	□	■	□	■	□	□	■	■	■	□	■	■	□	□	□	□	■	□	■	■	□	■	■
Cy3	□	□	□	□	■	□	□	□	■	□	■	□	■	□	■	■	□	■	■	■	□	■	□	■
TR	■	□	□	■	■	■	□	□	□	□	□	■	□	■	■	□	□	■	□	□	□	■	■	□
Cy5	■	□	■	■	□	□	■	□	□	■	□	■	□	□	■	□	■	□	■	■	□	■	□	■
Cy5.5	□	■	■	□	■	■	■	□	■	□	□	■	□	□	□	■	□	□	□	□	■	■	□	■

图 4.6.3　产生 24 色 FISH 实验的组合标记方案。不同荧光染料的组合使每个染色体涂染探针具有独特的光谱信号。

M-FISH 系统应用了 5 个单色滤光片激发/发射装置，在组合标记的方法中，每个滤光装置对应一种荧光染料。5 种不同的曝光时间（不同滤光器暴露时间不同）组合在

一起产生了一个多色图像。现在大部分 M-FISH 系统能够自动选择滤光装置，能够使发生在两次曝光间的图像记录差别减小到最小。根据每个像点，评定每种荧光染料信号是否存在或缺失，再比较探针标记方案来确定染色体的结构。与 SKY 相似，中期铺片的图像可以转换为核型图，特异的伪色的应用以最大限度地分辨染色体。

Applied Spectral Imaging 公司提供 SKY 系统。Applied Imaging、Leica Microsystems、Metasystems、Perceptive Scientific Instruments 及 Vysis 公司（从 Applied Imaging 中独立出来的）提供了 M-FISH 细胞遗传学图像分析平台。SKY 使用 FITC、罗丹明（或 Cy3）、德克萨斯红、Cy5 和 Cy5.5。对 M-FISH 来说，各公司常使用独特的荧光染料和荧光染料组合。实际上，SKY 和 M-FISH 仅仅在计算和分析多色图像时不同，所以理论上应用于 SKY 的探针同样可以用于 M-FISH。

SKY 和 M-FISH 系统可以快速地鉴定染色体之间的重排（即非同源染色体的相互易位），而不需要事先知道是否有染色体的畸变。两个系统均能辨别额外染色体的来源。用混合荧光染料标记时，具有中度或高度重复 DNA 的异染色质区域可能不被标记上荧光，产生无信号的数据。研究双微体时，通过 SKY 或 M-FISH 确定了它们染色体的来源也就知道了各自 DNA 扩增的染色体来源。然而，这两个系统不能检测染色体内的扩增、缺失和倒位。

据报道 SKY 系统进行染色体易位像点分类的准确度达到 98%，分辨率是 0.5～1.5Mb（Schröck *et al.*，1996）。Speicher 等（1996）和 Eils 等（1998）提出 M-FISH 系统有相似的特异性和敏感性。当然，敏感性在很大程度上依赖于中期染色体铺片的质量。接下来，预处理和 DNA 变性后染色体的完整性、染色体的长度是影响系统分辨力的最重要因素。因此，从肿瘤样本获得的短染色体敏感性自然就下降了。分析重叠染色体或少量染色体的易位是更复杂的情况。此时，重叠荧光信号可能导致染色体区域的错误定位。因此，有时需要用传统的单色或双色 FISH 实验验证 SKY/M-FISH 的许多结果。

Rx-FISH

虽然长臂猿 DNA 和人类 DNA 有 98%的同源，但相对于长臂猿染色体来说，人类染色体出现了广泛的重排，这样使得来自于长臂猿染色体的探针杂交在人类亚染色体区域的特异位置上（图 4.6.4）。当所有长臂猿染色体一起被标记并同时与人类中期染色体杂交时，一个特有的条带模型产生了。Rx-FISH 探针集（applied imaging）来源于一种长臂猿的染色体，相对于人类它的核型出现了非常广泛的重排。染色体特异性涂染探针来自于所有 27 条长臂猿染色体，并用三种荧光染料进行了组合标记：Cy3、Cy5 及 FITC。当 Rx-FISH 探针集与正常人类染色体杂交时，人类单倍体基因组产生了 8 种不同颜色的 90 条带。组合标记产生了 7 种颜色，没有杂交的区域（通常是着丝粒异染色质区域）是黑色的。人类染色体 15、18、21、22、X 和 Y 不能显示带型，只能染上单一的颜色。限制 Rx-FISH 探针集分辨率的一个因素是相对于人类这种长臂猿核型自然产生的染色体重排数量。与其他种类长臂猿探针混合，带型分辨率能够从 90 条带提高到 98 条带。额外多出的几条带来自于人类染色体 2、5q、10p、11q、14q 和 16p。用组合方案标记时增加两个荧光染料同样也能提高 Rx-FISH 探针集的分辨率，但是提高分

辨率后探针的花费增加，而且需要新的硬件和软件分析产生的 FISH 数据。任何适合的三滤光系统和手动分类都可以捕捉到 Rx-FISH 的图像。另外，由 Applied Imaging（AI）公司提供的该系统还能够进行图像的自动分析。

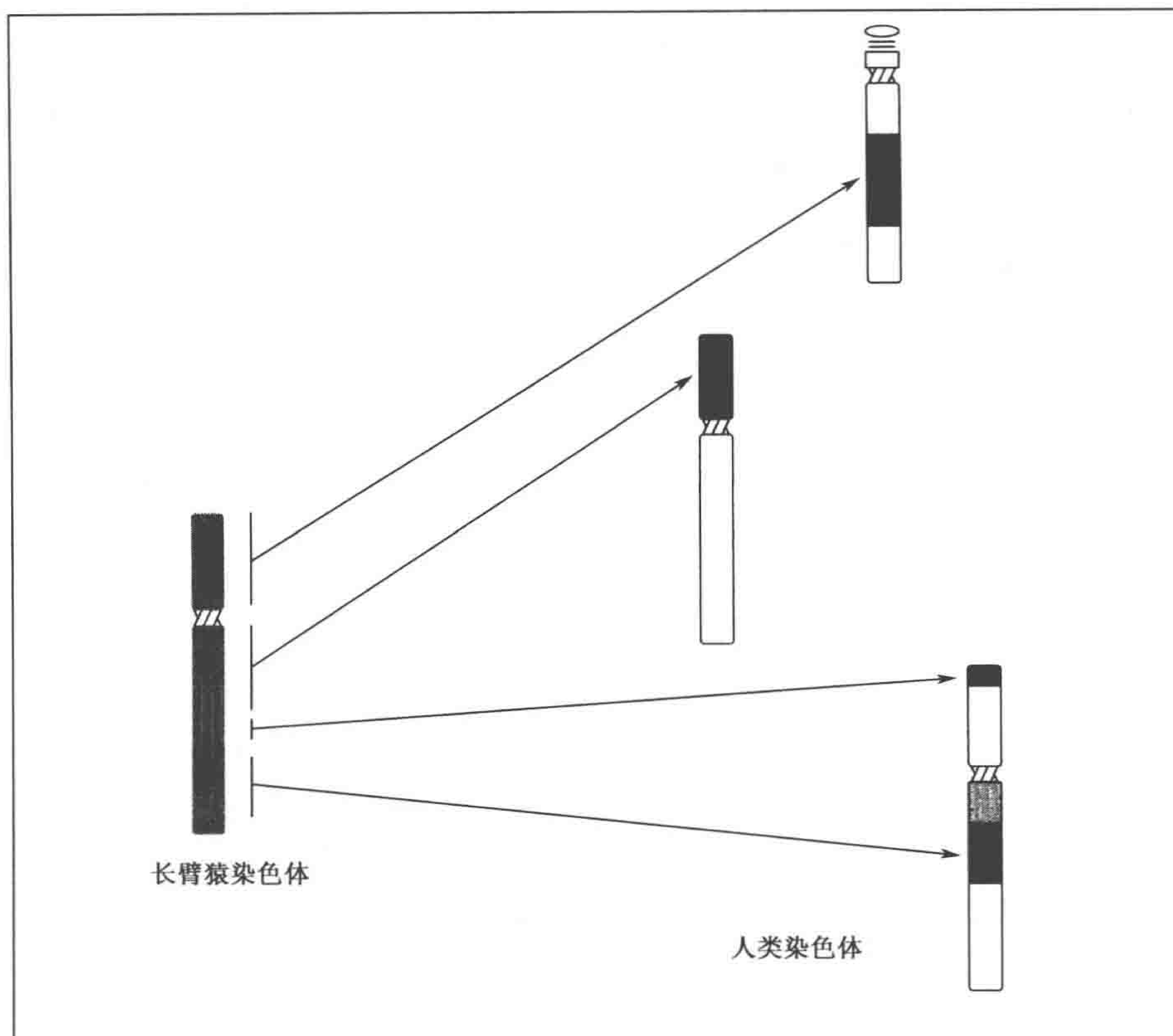


图 4.6.4　图示表示了一条长臂猿染色体与几条人类染色体的亚同源区域。在这个例子中，一条染色体特异性长臂猿涂染探针杂交到三条不同人类染色体的四个特殊同源片段上。

虽然 Rx-FISH 有鉴别染色体间重排的潜力，但鉴定易位时必须要有不同颜色的染色体区域参与。相同颜色的易位条带通过这个系统分析会被遗漏。Rx-FISH 同样有鉴别额外染色体来源的潜力，然而当额外染色体只被染上一种颜色时，就有几种可能的来源。Rx-FISH 主要的优点在于可以检测染色体倒位。臂内倒位如果发生在单一颜色条带的区域内将不能检测。总之，Rx-FISH 能够结合传统的带型分析和其他的分子细胞遗传学技术建立更加准确的核型图。

有人认为，染色体很短时 Rx-FISH 产生的彩色带型灵敏度不如传统带型技术。但是当我们分析那些低分裂指数、染色体高度浓缩、复杂的染色体重排、多克隆来源的肿瘤细胞时，传统 G 显带技术往往提供的信息有限，而 Rx-FISH 被证实是实用的。

比较基因组杂交

比较基因组杂交（comparative genomic hybridization，CGH；单元 4.8）可以检测

染色体内的重复和缺失。在一次杂交实验中CGH扫描整个人类基因组检测不同拷贝数的DNA序列。这项技术常应用于肿瘤样本分析、筛查潜在的原癌基因位点（扩增）或抑癌基因位点（缺失）。CGH同样可以检测由于不平衡易位导致的重复或缺失。在一个经典的CGH实验中，标记了一种半抗原的待检组织DNA与标记了另外一种半抗原的正常参考基因组DNA等摩尔比混合。混合探针同时与正常“靶”中期染色体杂交。如果未知样本DNA直接或间接标记上绿色荧光、正常参考DNA直接或间接标记上红色荧光，则大部分染色体区域将出现黄色荧光。未知样本DNA扩增将会使扩增位置的绿色-红色比升高。相反，未知样本DNA缺失时使绿色-红色比下降。CGH分析程序是测定整条染色体上红色和绿色荧光的强度，减去背景信号，拍摄荧光图像。Applied Imaging、Leica Microsystems、Perspective Scientific Instruments及Vysis公司（从Applied Imaging中独立出来的）提供CGH分析系统。

不像前面提到的FISH技术，CGH使用基因组DNA而不是中期染色体。这就表明待检样本的DNA不是必须要新鲜或完整的核。检测标本不需要细胞培养，高分子质量DNA不再需要。而且当给定的肿瘤样本很少或者仅保存小数量石蜡包埋的组织时，DOP-PCR能够扩增和标记纳克级的模板DNA。

CGH检测的敏感性依赖染色体受累区域的片段大小、扩增或缺失的大小、标本中那些有染色体缺失或扩增的细胞的比例和“靶”中期染色体的收缩。当较好的中期染色体被制备或购买，并且待测样本假定有相关的同质的遗传构成（在大多数肿瘤样本中不常见），检测敏感性主要决定于拷贝数目改变的产物量和异常染色体区域片段大小。在理想的样本中，如果重复的染色体区域至少有2Mb，那么理论上能检测到50%拷贝数增加（如在双倍体细胞中2或3非重复DNA序列拷贝数的增加）。实际上，当染色体的异常区域超过5Mb时，就能检测到DNA的扩增。用一组探针对标本染色体CGH结果显示的兴趣区域进行FISH实验能够缩窄涉及的区域。

参考文献：Cremer *et al.*, 1988；Kallioniemi *et al.*, 1994；Lichter *et al.*, 1988；Pinkel *et al.*, 1988；Schröck *et al.*, 1996；Speicher *et al.*, 1996

编　　者：Charles Lee，Willem Rens，Fengtang Yang

单元4.7　应用形态学抗体染色体技术确定细胞的表型与基因型

在设计MAC实验时，需要做出大量选择（参照表4.7.1中的大纲）——标本制备的方法、细胞表型分析的方法（表4.7.2）、细胞基因型分析的方法（表4.7.3）、是否表型和基因型能被同时分析或连续分析。用APAAP和吉姆萨复染的免疫学对表型的分析适合于所有类型的细胞和准备，是检测抗原最为敏感的技术之一。可作为选择的是免疫试剂能够耦合辣根过氧化酶和荧光素。用原位杂交技术的基因型分析适合于间期和中期细胞，而染色体显带技术仅能用于中期细胞。也可把原位杂交技术和染色体显带技术相结合。一般来说，同时对基因型和表型进行检测较连续检测更快，但精确性稍差。当应用重复序列探针仅对大量间期细胞的抗原进行分析时，同时检测APAAP的免疫表

型和酶的原位杂交信号是值得推荐的。当中期染色体用全染色体涂染探针的荧光原位杂交对基因型分析或当间期细胞在APAAP和免疫过氧化酶表型分析后，用单拷贝探针基因型分析，对这样的检测同期信号是非常困难的，因为APAAP和免疫过氧化酶反应阻止了酶的或荧光的小信号的检测。然而在免疫荧光表型分析后，可以通过荧光同期检测，甚至单拷贝探针。当应用特异序列探针（如质粒、contig、YAC）仅对大量间期细胞的抗原进行分析时，推荐使用表型和原位杂交信号的同期荧光检测。当应用荧光原位杂交和全染色体涂染探针对用细胞离心涂片器或原位培养制备的中期细胞进行分析时，当需要对切片或涂片进行精确的形态学和组织学分析时或当用细胞离心涂片器或原位培养制备的中期细胞用G显带分析时，推荐使用表型和基因型连续的检测方案。

表 4.7.1　MAC分析的准备和分析技术的综合[a]

功能	方法			
样品	细胞离心涂片器（支持方案1）			
准备	原位培养（支持方案2）			
	组织切割（支持方案3）			
	血液和骨髓涂片（支持方案4）			
表型	APAAP（碱性磷酸酶抗-碱性磷酸酶）（基本方案1）			
	免疫过氧化物酶（备选方案1）			
	免疫荧光素（备选方案2）			
基因分型	体系	探针	检测	细胞期
	原位杂交	重复序列	酶	间期，中期
	原位杂交	重复序列	荧光	间期，中期
	原位杂交	单拷贝	荧光	间期，中期
	原位杂交	全染色体图染	荧光	中期
	G带	NA	吉姆萨	中期
	Q带	NA	荧光	中期
	C带	NA	吉姆萨	中期

a. 注解：APAAP，碱性磷酸酶抗-碱性磷酸酶；NA，不适用。

表 4.7.2　用于表型分析的技术

方法	方案	细胞类型	注解[a]
APAAP免疫细胞化学	基本方案1	所有类型	A：灵敏检测微小抗原；所有类型的细胞都能应用；可制成永久性标本；清楚的细胞形态 D：小的原位杂交信号在同期分析中不能被检测；时间消耗较长
免疫过氧化物酶	备选方案1	除骨髓细胞外	A：较APAAP快 R：内源性过氧化物酶的活性不能被全部消除 D：小的原位杂交信号在同期分析中不能被检测
免疫荧光	备选方案2	所有类型	A：所有种类细胞能被应用；快速；小的杂交信号能同时被检测 R：必须具备荧光显微镜 D：荧光随时间淬灭；微小抗原的抗体不能作用

a. A，优点；D，缺点；R，限制性。

表 4.7.3　用于 MAC 基因型分析的技术

方法	方案	注解[a]
原位杂交	基本方案 1	A：中期间期细胞都能检测；成功率较染色体显带技术高 R：需要特意性探针
染色体显带	基本方案 1 和备选方案 3	A：对染色体的变化有一个总的了解； R：必须为中期细胞 D：成功率低；小数量的细胞不能用于分析
原位杂交后的染色体显带技术	基本方案 2	A：对全部染色体的变化有一个总的了解，并且在基因组选定的区域进行有目的的分析 R：需要间期细胞和特异性探针 D：低成功率

a. A，优点；D，缺点；R，限制性。

注意：所有孵育必须在潮湿，37℃，5%CO_2 温箱中进行，除非特殊注明。

注意：表 4.7.4 提供了 MAC 的故障排除的指导。

表 4.7.4　MAC 故障排除指导

问题	可能原因	解答
细胞膜内的染色体分散差	低渗处理不够充分	减低低渗液中培养基的比率；增加离心力
细胞膜破裂	低渗处理过强	增加低渗液中培养基的比率；减低离心力
染色体形态模糊但免疫染色好	染色体固定差	减少固定剂中甲醛浓度
较差的免疫染色但染色体形态好	抗原固定不充分	增加固定剂中甲醛的浓度
	较低的抗原表达	增加抗体密度；在 APAAP 中，重复抗体检测的方案；抗体偶联后最小化洗涤条件；如果可能同时应用两种不同的抗体（如抗 CD19、抗 CD22，两者都能识别正常 B 细胞）
染色体无 G 显带	染色体固定较差或标本太久	免疫染色后立即显带
无杂交信号	探针制备差	增加胃蛋白酶（所有制备）和（或）NaSCN（除外细胞离心涂片制备）的浓度或持续时间
	染色体变性差	增加甲醛浓度
	染色体杂交差	改变变性条件（单元 4.4） 改变杂交条件
	探针检测不充分	改变杂交条件（单元 4.4）用标准的细胞遗传学制备检测条件
信号背景	过高的探针浓度	降低探针浓度
	洗涤不充分	改变洗片方法（单元 4.4）
	其他原因（单元 4.4）	

基本方案 1　应用 APAAP 免疫染色和原位杂交进行序列的 MAC 分析

图 4.7.1 为该过程的大纲。图 4.7.2 为 APAAP 检测策略的图解。其他碱性磷酸酶底物和其他色原体同样适用（表 4.4.1）。

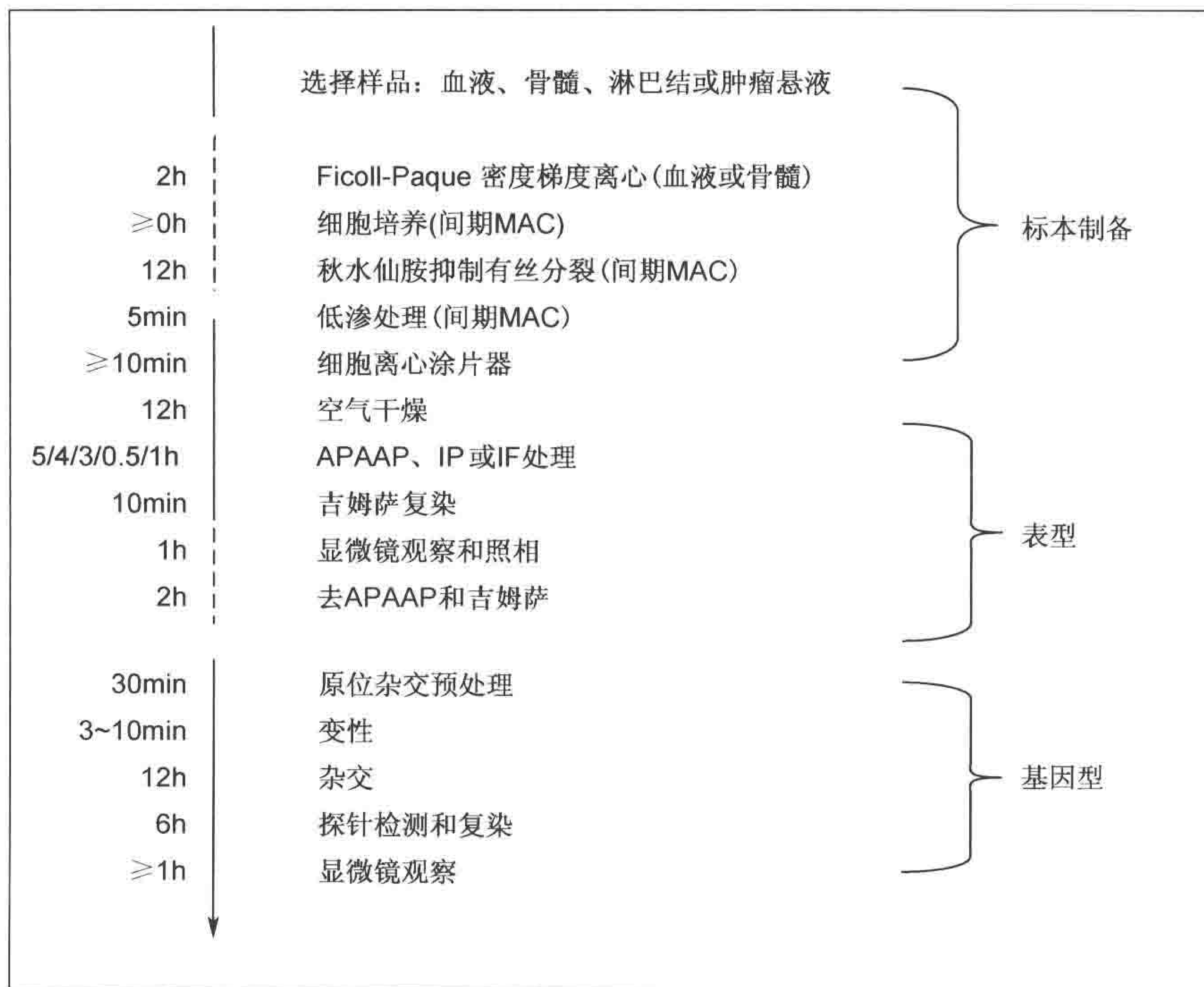


图 4.7.1　用于序列 MAC 分析的原位杂交技术大纲及所需时间，实线表示必须执行的方案，虚线表示选择性的方案。

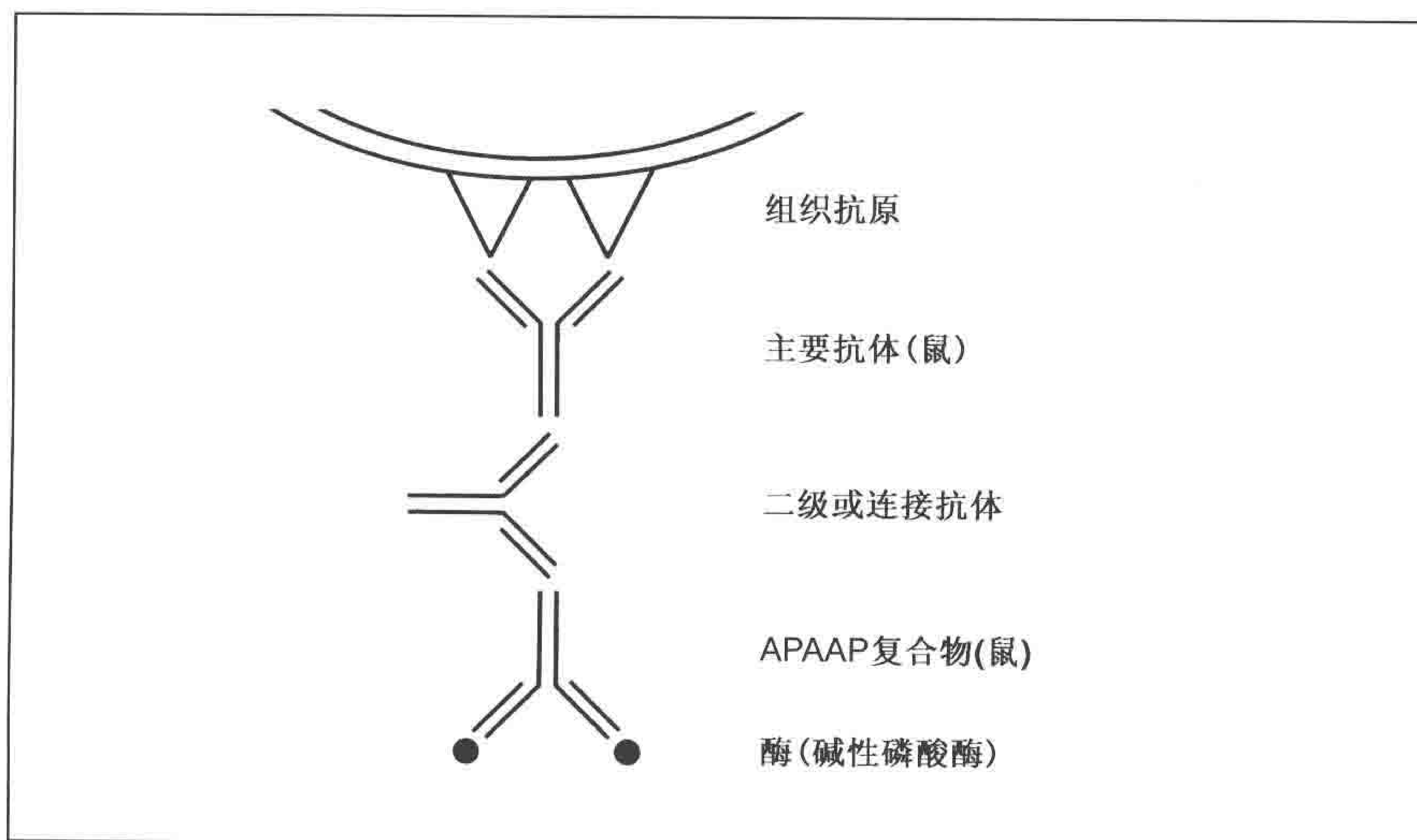


图 4.7.2　碱性磷酸酶抗碱性磷酸酶（APAAP）免疫染色机制图示。

材料（标√的条目参见附录1）

用于分析的空气干燥的细胞铺片（支持方案4）

√甲醛缓冲的丙酮固定剂，4℃

0.05%（V/V）Triton X-100（BDH）的PBS

√PBS

√TBS/FBS

鼠抗人主要抗体按1∶10～1∶50的比例用TBS/FBS稀释

√兔抗鼠Ig抗血清溶液

APAAP鼠免疫复合物（Dakopatts）按1∶25～1∶50的比例用TBS/FBS稀释

√APAAP底物溶液（用之前立即准备）

√5%的吉姆萨染液

95%乙醇

3∶1（V∶V）甲醇/冰乙酸固定剂

0.01mol/L HCl，37℃

0.1～1mg/ml胃蛋白酶用0.01mol/L HCl溶解（用之前立即加入胃蛋白酶）

生物素或地高辛标记的重复序列探针、单拷贝探针、全然色体涂染探针（单元4.4）

Harris苏木素染色（Papanicolaou溶液，Merck）1∶1用水稀释。

0.0025%（V∶V）氨水溶液

封片媒介：Entellan（Merck）或其他标准的细胞遗传学封片媒介用于酶的检测；用于荧光素检测的抗淬灭封片媒介（附录1）。

Coplin缸

细胞离心涂片器，过滤器（Shandon/Lipshaw）

保湿盒（图4.4.3）

0.45μm过滤膜（Millipore）

装有照相机的明视野显微镜，微米级，100×dry物镜

配有相机的显微镜，微米级，荧光素epiilunination，合适的滤光装置，100×物镜（可选择的，检测荧光）

1. 固定空气干燥的细胞铺片用于分析，在装有4℃甲醛缓冲的丙酮固定剂的Coplin缸中1min（细胞质和细胞膜结构必须完整）。
2. 在冷的自来水下冲洗2min。
3. 可任意选择的：除非膜抗原需要被研究以外，加0.05%（m/V）Triton X-100的PBS室温孵育10min，使细胞膜通透，用PBS冲洗玻片10min。
4. 在TBS/FBS的Coplin缸中迅速漂洗，在另一Coplin缸的TBS/FBS中洗10min。
5. 用cytospin filter吸去玻片上多余的液体。
6. 在玻片上加15μl稀释的主要鼠抗人抗体，湿盒中室温孵育30min。重复第4、5步。
7. 在玻片上加15μl稀释的兔抗鼠Ig抗体（2级或连接抗体，见图4.7.2）室温下湿盒中孵育30min。重复第4、5步。

8. 在玻片上加 15μl 稀释的 APAAP 鼠免疫复合物，室温湿盒孵育 30min。重复第 4、5 步。如果 APAAP 反应微弱，通过重复第 7、8 步增强信号。
9. 用 0.45μm 过滤膜过滤 APAAP 底物溶液，直接加在玻片上。室温下湿盒孵育 20min。冷自来水冲洗 2min，室温下空气干燥过夜。

玻片可用吉姆萨复染（第 10～12 步）观察染色体形态，如不需要直接参见第 13 步。

10. 在 5%吉姆萨染液中复染 10min，迅速在冷自来水下冲洗。
11. 用装有干燥 100×物镜的显微镜明视野下观察玻片（未封片），用微米级的显微镜摄像，并标记好阳性细胞的正确坐标。彩色玻片用 Ektachrome 64T（彩色反转片）观察。
12. 将玻片在 95%乙醇中浸泡 10min，在 3∶1 的甲醇/冰乙酸固定剂中 20℃孵育 1～12h。
13. 按照以下方案预处理玻片：
    37℃ 0.01mol/L HCl 孵育 10min；
    37℃ 0.1～1mg/ml 胃蛋白酶用 0.01mol/LHCl 溶解孵育 4～10min；
    室温下在装有蒸馏水的 3 个 Coplin 缸中逐一迅速漂洗。
    通过改变胃蛋白酶的浓度和处理时间使探针穿透达到最佳，也可见支持方案 2～4 的条件。
14. 室温下空气干燥 10min。
15. 根据单元 4.4 基本方案第 1～8 步的叙述将生物素或地高辛标记的重复序列探针（用于同期或相继的检测）与玻片杂交。也可应用单拷贝或全染色体涂染探针（所需的序列检测）。

酶的检测

16a. 根据单元 4.4 备选方案 1 的叙述用酶检测生物素（酰）化的探针（也可应用其他方法）。
17a. 室温下苏木素染色 30s，迅速地在 0.0025%（*V*/*V*）氨水中冲洗，室温下水迅速冲洗。
18a. 用 Entellan 或细胞遗传学标准的封片媒介封片，不能应用 Entellan 进行同期分析，因为可能会消除 APAAP 的反应产物。
19a. 应用 100×油镜观察玻片并用它给在第 11 步当中的同一区域拍照。

荧光素检测

16b. 按照单元 4.4 基本方案第 8～11 步的叙述过程和单元 4.4 支持方案 1 或 2 的详述用荧光素检测杂交的生物素标记的探针。
17b. 用 DAPI 或者 Propidium 复染用荧光素标记的样品（参见单元 4.4 基本方案第 12、13 步）。
18b. 用抗淬灭的封片媒介封片。
19b. 用 100×物镜观察玻片进行分析，并对第 11 步当中拍照的同一区域进行分析。

备选方案 1　应用基于 HRP 的检测进行免疫分型

应用辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）可以检测联合的主要抗体，而取代 APAAP 法，但用此法检测联合的主要抗体（图 4.7.3）较 APAAP 法花费的时间更长，但一些抗体（如抗 B 细胞标记）实际上用此法更好检测。另外，免疫过氧化物酶比间接的免疫荧光法更灵敏。免疫过氧化物酶表型和原位杂交的信号，可以同时或相继用于酶的或荧光的探针的检测。

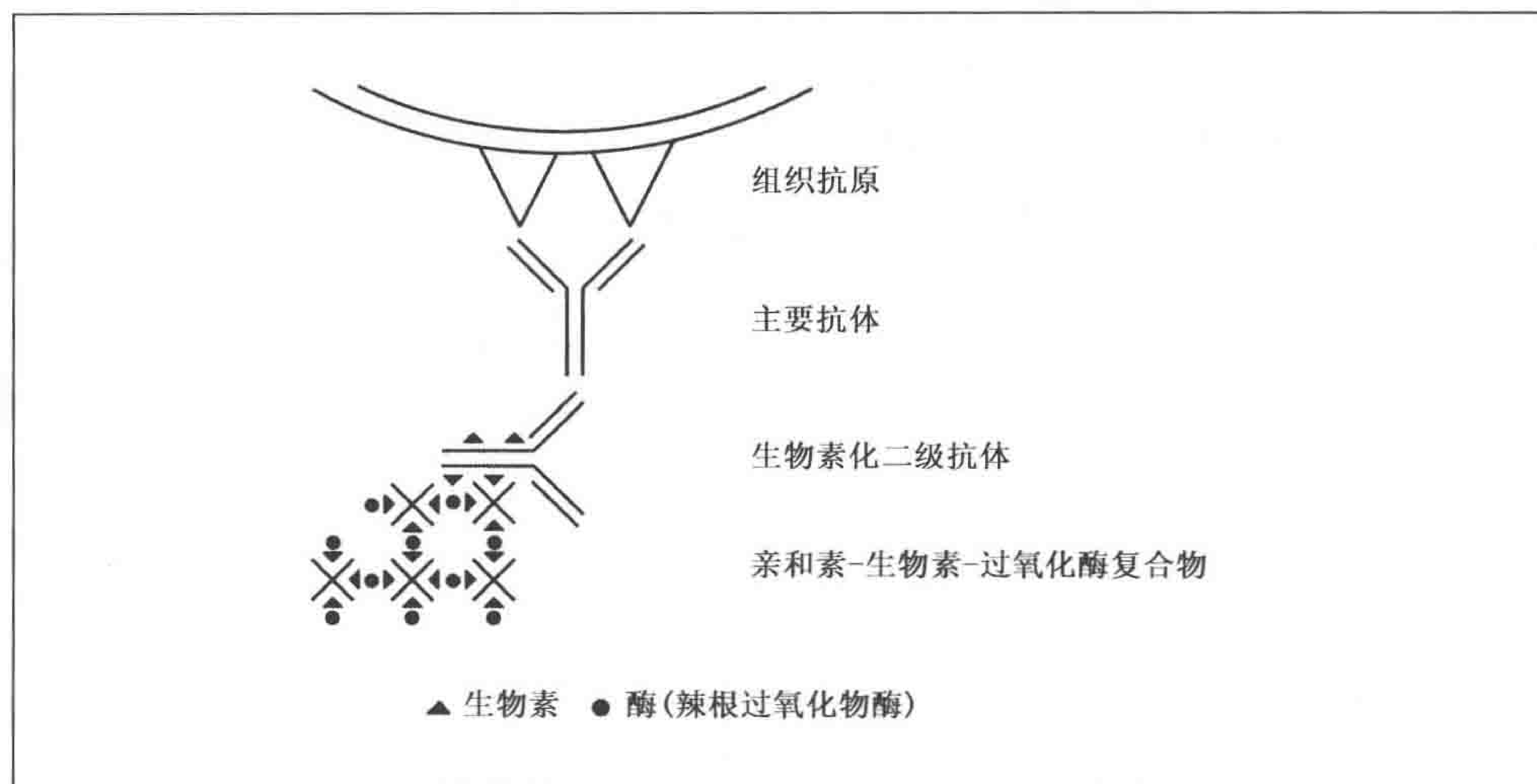


图 4.7.3　免疫过氧化物酶染色示意图。

附加材料（见基本方案 1；标√的条目参见附录 1）

1%（V/V）H_2O_2 的甲醇

√丙酮/甲醇固定剂

PBS/FBS：0.08%、0.2% 和 5%（V/V）灭菌过滤器（1.2μm 过滤器）FBS 的 PBS

正常马血清按 1∶50 稀释的 PBS/5%（V/V）FBS

鼠抗人主要抗体用 PBS/5%（V/V）FBS 按 1∶10～1∶50 稀释

生物素化的抗鼠 IgG 二级抗体按 1∶250 的 PBS/5%（V/V）FBS 稀释

ABC kit（Vectastain）含有亲合素 DH 和生物素化的辣根过氧化物酶 H（HRP）

√免疫过氧化物酶底物溶液

1. 如果需要，则通过用 1%（V/V）H_2O_2 的甲醇室温下玻片孵育 30min 封闭内源性过氧化物酶的活性。
2. 将存有细胞的已空气干燥的玻片置于 4℃丙酮/甲醇固定剂的 Coplin 缸中 1min，迅速地在冷自来水下冲洗玻片 2～3min。
3. 任意选择：除非膜抗原需要被研究以外，加 0.05%（m/V）Triton X-100 的 PBS 室温孵育 10min，使细胞膜 permeabilize，用 PBS 冲洗玻片 10min。

4. 在 PBS/0.08%FBS 的 Coplin 缸中迅速漂洗，用 cytospin filter 吸去玻片上多余的液体，使细胞保持湿润直到第 10 步。
5. 在玻片加 25μl 稀释的正常马血清，湿盒中室温下孵育 30min，除去过剩的马血清，迅速吸干玻片。
6. 加 20μl 鼠抗人主要抗体，湿盒中室温下孵育 1h。迅速在 PBS/0.2%FBS 中冲洗，在新鲜 PBS/0.2%FBS 冲洗 10min，吸干玻片。
7. 加 20μl 生物素化的抗鼠 IgG 二级抗体，湿盒中室温下孵育 30min，冲洗及干燥同第 6 步。
8. 等体积混合亲合素 DH 和生物素化的辣根过氧化物酶 H 形成亲合素-生物素复合物，混合物按 1∶160 用 PBS/5%FBS 稀释。
9. 加 20μl 亲合素-生物素复合物，湿盒中室温下孵育 30min。迅速在 PBS/0.2%FBS 中冲洗并干燥。
10. 在装有免疫过氧化物酶底物溶液的 Coplin 缸中室温下孵育 20min。迅速在装有 PBS 的 Coplin 缸中冲洗，随后迅速在装有蒸馏水的 Coplin 缸中冲洗，室温下空气干燥过夜。
11. 用吉姆萨复染玻片（可选择：基本方案 1，第 10～12 步）和进行原位杂交（基本方案 1，第 13 步之前）。应用标准的细胞学封片媒介并且用 100× 干燥物镜观察玻片，因为 Entellan 和浸入的油都可能消除棕褐色的反应产物。

备选方案 2　应用荧光素检测进行免疫分型

免疫荧光分型可以通过酶的或荧光素的原位杂交探针的检测用于连续的或同期的分析。另外，尽管该方法较 APAAP 和 HRP 灵敏性稍差，但比后两者快速，并且通过仔细选择荧光素能够对免疫荧光分型结果进行同期检测。单拷贝和重复序列探针适用于间期核的原位杂交，而全染色体涂染探针则适用于中期核的原位杂交。

附加材料（见基本方案 1；标√的条目参见附录 1）

√丙酮 /甲醇固定剂
PBS/FBS：0.2%（*V/V*）过滤灭菌 FBS、PBS
鼠抗人主要抗体用 PBS/0.2%FBS 稀释至 1∶10～1∶30
荧光素偶联的羊抗鼠 IgG 二级抗体（Cappel）用 PBS/0.2%FBS 稀释至 1∶200
√0.5%（*m/V*）奎纳克林氟安定

1. 空气干燥的细胞玻片在 4℃ 的丙酮 /甲醇固定剂中固定 1min，在冷自来水下冲洗 2～3min。
2. 可选择的：除非膜抗原需要被研究以外，加 0.05%（*m/V*）Triton X-100 的 PBS 室温孵育 10min，使细胞膜 permeabilize，用 PBS 冲洗玻片 10min。
3. 迅速在 PBS/0.2%FBS 中漂洗，吸干玻片上的液体，使玻片保持湿润直到完成所有方案。
4. 加 20μl 稀释的鼠抗人主要抗体，湿盒中室温下孵育 30min。在新鲜 PBS/0.2%FBS 迅速冲洗 2 次，吸干玻片。

5. 加 20μl 稀释的荧光素偶联的山羊抗鼠 IgG 二级抗体，湿盒中室温下孵育 30min，迅速在 PBS/0.2%FBS 中漂洗，并吸干。
6. 用 0.5%（*m/V*）奎纳克林氟安定复染 10min 进行荧光原位杂交前先进行 Q 带评价。
7a. 用于连续的分析：用装有合适滤片的荧光显微镜观察玻片，去处荧光素（基本方案 1，第 12 步）进行原位杂交（基本方案 1，第 13 步前）
7b. 用于同期分析：直接用于原位杂交（基本方案 1，第 13 步前）。除了应用于免疫表型外可以应用不同荧光素的荧光探针。

备选方案 3　染色体 C 带或 G 带基因型

细胞离心图片器和原位培养（支持方案 1 和 2）的应用可以得到中期染色体，通过单元 4.3（图 4.7.4）中所述的染色体显带技术能够进行基因分型。任何一种显带技术均能同时用于表型分型的技术。当免疫荧光表型分型被完成，免疫染色后不需要任何再固定，Q 显带技术也可被应用。但 G 显带和 C 显带还有姐妹染色单体互换则需要酸性再固定。G 显带和 C 显带需要用明视野显微镜观察，并可以同 APAAP 和 HRP 免疫染色相结合。如果需要的话，在显带后还可进行原位杂交（基本方案 2）。

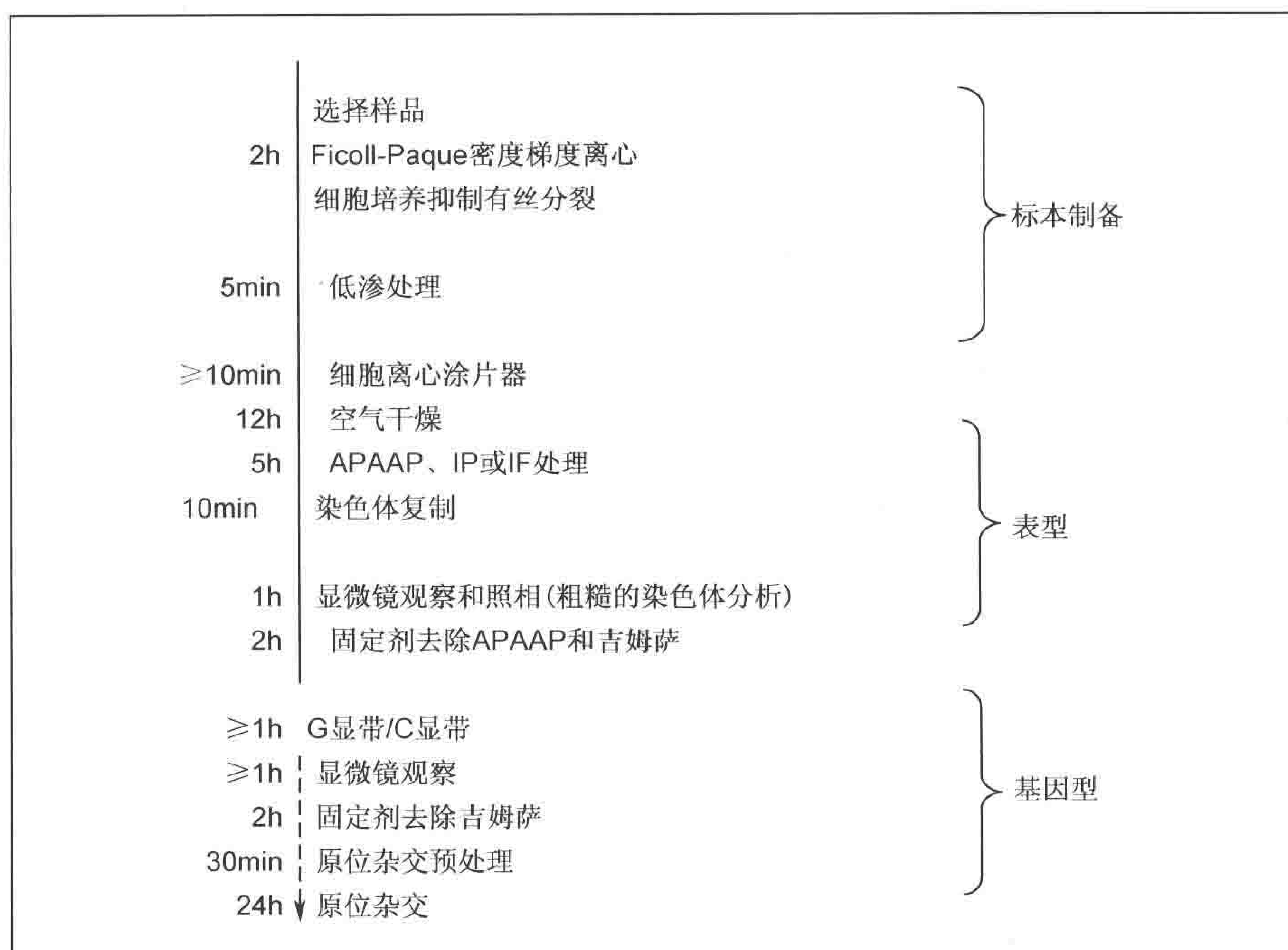


图 4.7.4　用于序列 MAC 分析的染色体显带技术大纲及所需时间，实线表示必须执行的方案，虚线表示选择性的方案。

附加材料（见基本方案 1）

细胞来源于细胞离心涂片器或原位培养制备（支持方案 1 和 2）
60℃烤箱

1. 应用 APAAP（基本方案 1，第 1～10 步）、HRP（备选方案 1）或免疫荧光（备选方案 2）等方法对细胞离心器或原位培养的细胞进行表型的检测。
2. 将玻片在装有 95％乙醇的 Coplin 缸中孵育 10min。
3. 将玻片在装有 3∶1 的甲醇/冰乙酸固定剂的 Coplin 缸中 20℃孵育 1～12h。
4. 60℃烤箱中空气干燥 18～24h。
5. 完成 G 或 C 显带（单元 4.3）。对于 G 显带则要增加一步胰酶消化 10min。
6. 可选择：执行原位杂交（基本方案 2）。

支持方案 1　细胞离心涂片的制备

具有分裂活性的细胞用促有丝分裂剂处理，以增加中期染色体的数量（图 4.7.5）；如细胞不具有分裂活性（如纯化的粒细胞）或者间期细胞需要被分析，促有丝分裂剂的刺激被消除。悬浮细胞应用细胞离心图片器制备优于滴片或是空气干燥细胞（单元 4.1）和涂片等方法的制备。

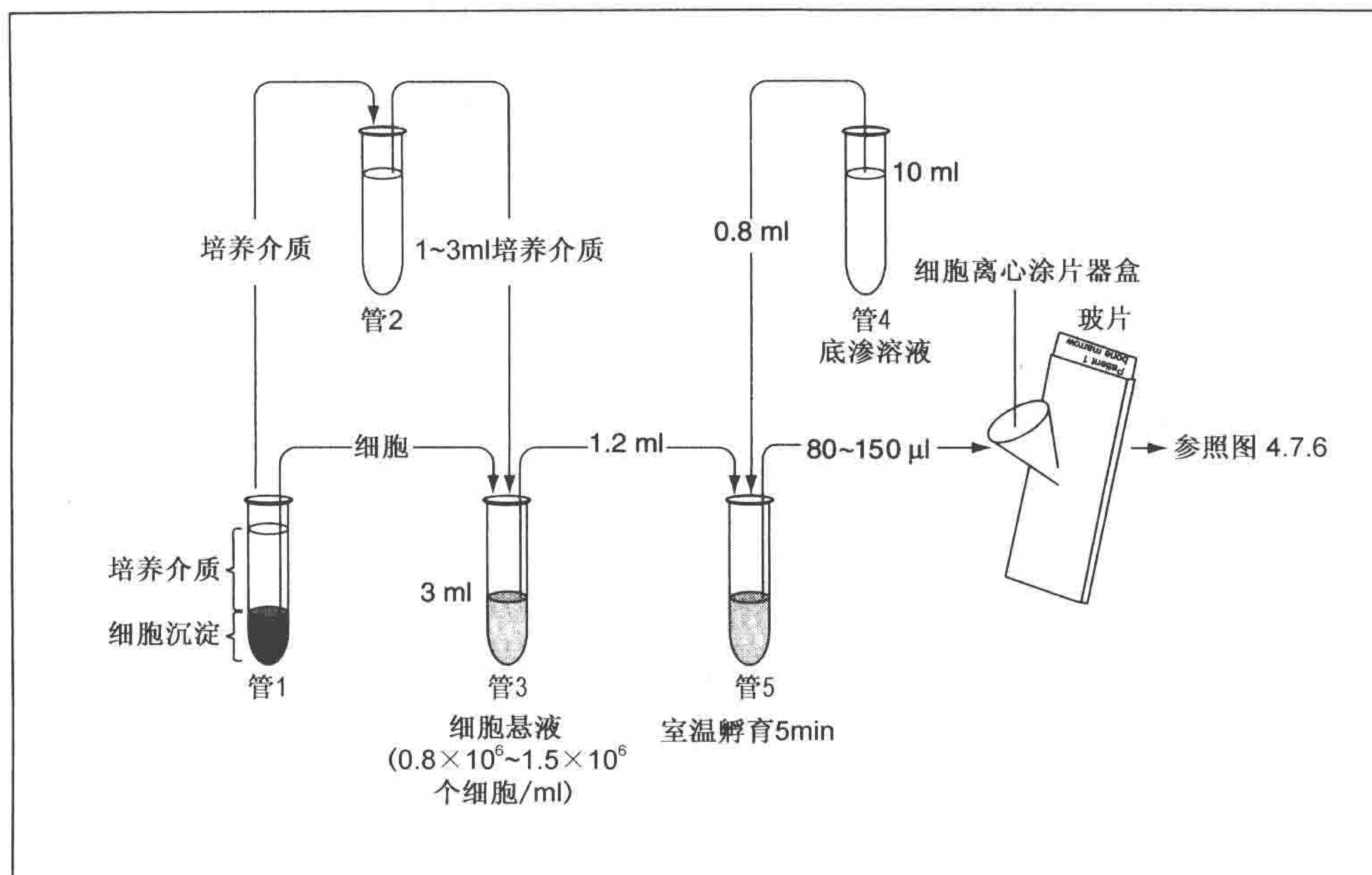


图 4.7.5　渗处理及细胞涂片制备的图示。

材料（标√的条目参见附录 1）

样本(如肝素抗凝血、骨髓、悬浮肿瘤细胞）或培养的细胞（悬浮培养或胰蛋白酶作用的单层细胞）

外周包裹有所需抗体的免疫磁珠（如 Dynal Dynabeads M-450、Miltenyi Biotec MiniMASCO；可任意选择）

促有丝分裂剂：12-O-四葵酸佛波乙酯（12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate；

TPA，Sigma；针对 B 淋巴细胞）、植凝集素（PHA，Sigma；针对 T 淋巴细胞）或其他促有丝分裂或生长因子（可任意选择）

秋水仙酰胺（可任意选择）

√MAC 低渗溶液，20℃

50ml 组织培养瓶（Nunc）

10ml 一次性聚丙烯圆锥底离心管

细胞离心涂片器（Shandon，Lipshaw）

乙醇洗净的玻片

细胞离心涂片器过滤器（Shandon、Lipshaw）

1. 如果必须应用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心（单元 10.3）或葡聚糖沉降法从标本中除去红细胞。如必须进一步去除单核淋巴细胞可进一步利用包裹有适合抗体的免疫磁珠分离细胞亚族。
2. 用完全 RPMI/20%FBS 重悬单核细胞使之密度为 10^6 个/ml，加 5～10ml 细胞悬液到 50ml 组织培养瓶。如果需要在组织培养瓶中加入促有丝分裂剂以增加中期分裂相的数目（如 0.5μg/ml PHA 针对 T 淋巴细胞、2μg/ml TPA 针对 B 淋巴细胞在慢性淋巴组织发育阻碍白血病中）。
3. 在 37℃，5%CO_2 温箱中培养 12h 至 4d。
4. 为了得到分裂中期染色体，培养一开始即加入终浓度为 0.4μg/ml 的秋水仙酰胺（针对骨髓细胞）或在指数增长期加入（针对其他类型细胞）。继续 37℃培养 12h，选择最佳条件，如果需要可延长培养时间或者用高浓度秋水仙酰胺以达到最大数目的分裂中期相，但作用时间要短，以免影响染色体形态，如长度及带型。
5. 将细胞和培养基转移至 10ml 一次性聚丙烯圆锥底离心管（图 4.7.5 中的管 1），室温 180*g* 离心 10min。将上清倒入另一管中（图 4.7.5 中的管 2）并保存。
6. 重悬离心的细胞沉淀物，并用血细胞计数器（附录 3I）计数，加入足够上清液使细胞悬液浓度为 0.8×10^6～1.6×10^6 个/ml（图 4.7.5 中的管 3）。
7. 将 1.2ml 细胞悬液（足够 12 张玻片）转移至 10ml 一次性聚丙烯圆锥底离心管（图 4.7.5 中的管 5）中，加入 0.8ml 低渗液并混合（4×10^5～7.5×10^5 个/ml 终浓度）。室温下 5min。应用第 6 步的悬液或相同的粒细胞悬液、培养悬液细胞或用蛋白酶处理的单层细胞。间期细胞的置备不需加促有丝分裂剂。
8. 装好细胞离心涂片器、乙醇清洁的玻片细胞离心涂片滤纸备用。将 80～150μl 低渗细胞悬液转移至细胞离心涂片器盒室温 400*g* 离心 5～10min。
9. 需额外的玻片，则重复第 7 和 8 步，准备一次使用完的细胞悬液量。每次实验备用 10～20 张清洁玻片。
10. 室温空气干燥 12h 细胞离心涂片器制备的玻片（图 4.7.6）。室温下至多 3 周，或 −20℃或 −70℃保存用于 MAC 表型、基因型分析（涂片室温下保存 2～5d 最佳）。如果是冰冻保存的涂片则室温空气干燥 10～24h 即用于细胞免疫化学处理或用于原位杂交。

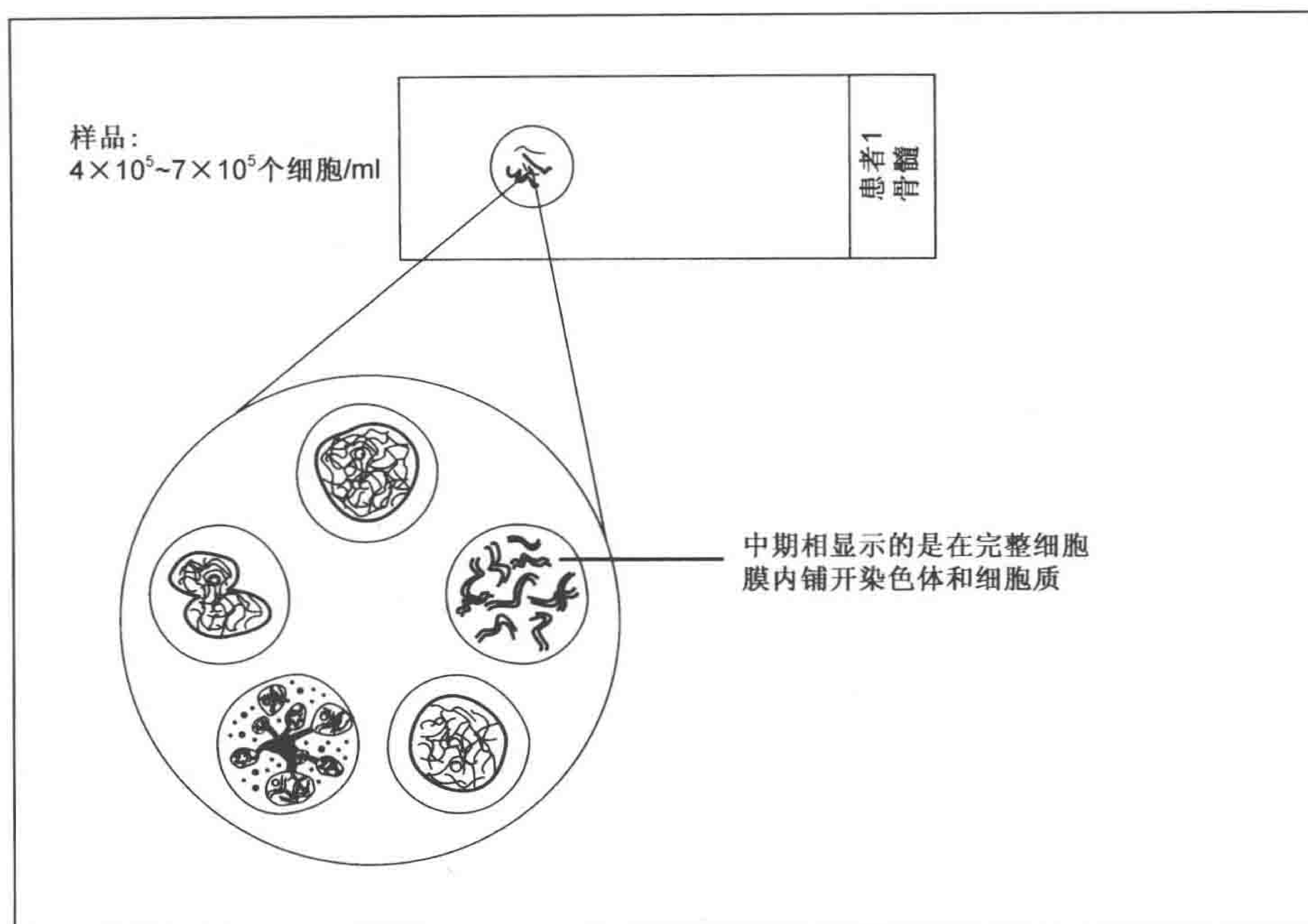


图 4.7.6　细胞离心涂片器制备图示。

支持方案 2　原位培养的准备

MAC 低渗溶液可以直接应用于单层细胞。因为间期细胞在酶的消化和洗涤过程中不会丢失，并且胰蛋白酶敏感抗原不会受影响，如果单层肿瘤细胞数目（10^4～10^5个）和分裂指数都较低，该操作方法是较合适的。

材料（标√的条目参见附录 1）

黏附细胞（如肿瘤组织或细胞、成纤维细胞）
√完全 RPMI/20%FBS
蛋白水解酶（针对活组织）
秋水仙酰胺
√MAC 低渗溶液
0.01mol/L HCl，37℃
胃蛋白酶：0.1～1mg/ml 溶解在 0.01mol/L HCl 中，37℃
15ml 培养瓶

1. 准备浓度约为 3.3×10^5个/ml，用完全 RPMI/20%FBS（支持方案 1，第 1 和 2 步，附录 3I）作媒介的细胞悬液，针对肿瘤活组织，首先在完全 RPMI/20%FBS 中切碎样品并补充蛋白水解酶易于组织裂解。
2. 在 15ml flaskette chamber slide 中培养直到细胞形成非重叠的单层或者可以观察到有丝分裂指数。

3. 加入秋水仙酰胺至浓度为0.4μg/ml继续孵育12h（支持方案1，第4步为最佳条件）
4. 倒出2ml培养液与2ml MAC低渗溶液混合，将混合物重新倒入培养瓶20℃孵育5min。
5. 倒出低渗溶液，将玻片从盒中取出。
6. 室温空气干燥玻片2d，按照支持方案1，第10步保存。
7. 免疫化学和细胞化学表型分析后，通过原位杂交进行基因型分析，除去反应产物（基本方案1，第12步）并按以下方案处理玻片（逐一应用直到最优化条件）：
   0.01mol/L HCl 37℃孵育10～30min；
   0.1～1mg 胃蛋白酶/ml 0.01mol/L HCl 37℃孵育10～30min；
   在水中冲洗3次。
   每次用一张玻片以确定最优化的酸处理时间和胃蛋白酶浓度及处理时间。
8. 执行酶的或荧光的重复序列，或单拷贝，或全染色体涂染探针原位杂交的检测。

支持方案3 组织切片的制备

从原则上说所有免疫染色的方法均适合石蜡和冰冻切片。对表型和原位杂交信号的同期和连续的分析都是适合的。切片能够从组织学和形态学对细胞特征进行描述。因为2或3连续的切片代表了组织或肿瘤的同一块区域，如果不需要在单细胞水平上分析，那么一块切片用做表型分析，另一块切片用做基因型分析。如果切片先前未进行过表型分析原位杂交能够在切片上产生较好的结果。因为仅有间期细胞被分析，重复序列和单拷贝探针被应用于杂交。

材料（标√的条目参见附录1）

5μm石蜡包埋或冰冻组织切片
二甲苯
浓度梯度乙醇：70%、95%、100%乙醇
1%（V/V）H_2O_2 甲醇二甲苯
100%甲醇
1mol/L硫氰酸钠72℃
0.01～0.1mol/L HCl，37℃
1～5mg/ml胃蛋白酶溶解在HCl，37℃
√多聚左旋赖氨酸涂层的显微镜玻片
60℃和70℃烤箱

1. 将5μm的石蜡包埋或冰冻组织切片固定在多聚左旋赖氨酸涂层的显微镜玻片上，如果应用冰冻切片，执行第4步。
2. 将玻片置60℃烤箱中过夜。
3. 通过用二甲苯孵育玻片3次，每次10min除去石蜡。
4. 在100%、95%、70%乙醇各孵育5min，室温空气干燥12～24h。
5. 任意选择：如应用HRP进行表型的分析，封闭内源性过氧化物酶（如必须）可通过室温下将玻片在1%（V/V）H_2O_2 甲醇孵育30min。在甲醇中漂洗5min，室温空气

干燥 12～24h。

6a. 石蜡包埋的组织切片的基因型：除去表型的染色（基本方案 1，第 12 步；同期分析则跳过）按照以下处理：

72℃ 1mol/L 硫氰酸钠孵育 10min；

37℃ 0.0～0.1mol/L HCl 孵育 10min；

37℃ 1～5mg/ml 胃蛋白酶的 0.01～0.1mol/L HCl 孵育 10～30min；

用水洗 3 次。

每次用一张玻片以确定最优化的酸处理时间和胃蛋白酶浓度及处理时间。用相同浓度含有胃蛋白酶或不含的 HCl 洗片。

6b. 冰冻切片的基因型：除去表型的染色（基本方案 1，第 12 步）按照以下预处理：

72℃ 1mol/L 硫氰酸钠孵育 5min；

37℃ 0.01～0.1mol/L HCl 孵育 10min；

37℃ 1～5mg/ml 胃蛋白酶的 0.01～0.1mol/L HCl 孵育 10～20min；

用水洗 3 次。

每次用一张玻片以确定最优化的处理时间。

7. 执行原位杂交（基本方案 1，第 14 步前）应用重复序列或单拷贝探针。

支持方案 4　血液和骨髓涂片的制备

制备好的涂片（图 4.7.7）要迅速但又必须熟练，血液和骨髓涂片同冰冻切片一样能应用于连续的免疫表型和基因型分析；但是涂片不含有分裂中期细胞，所以它不能等同于促有丝分裂冰冻切片的制备。

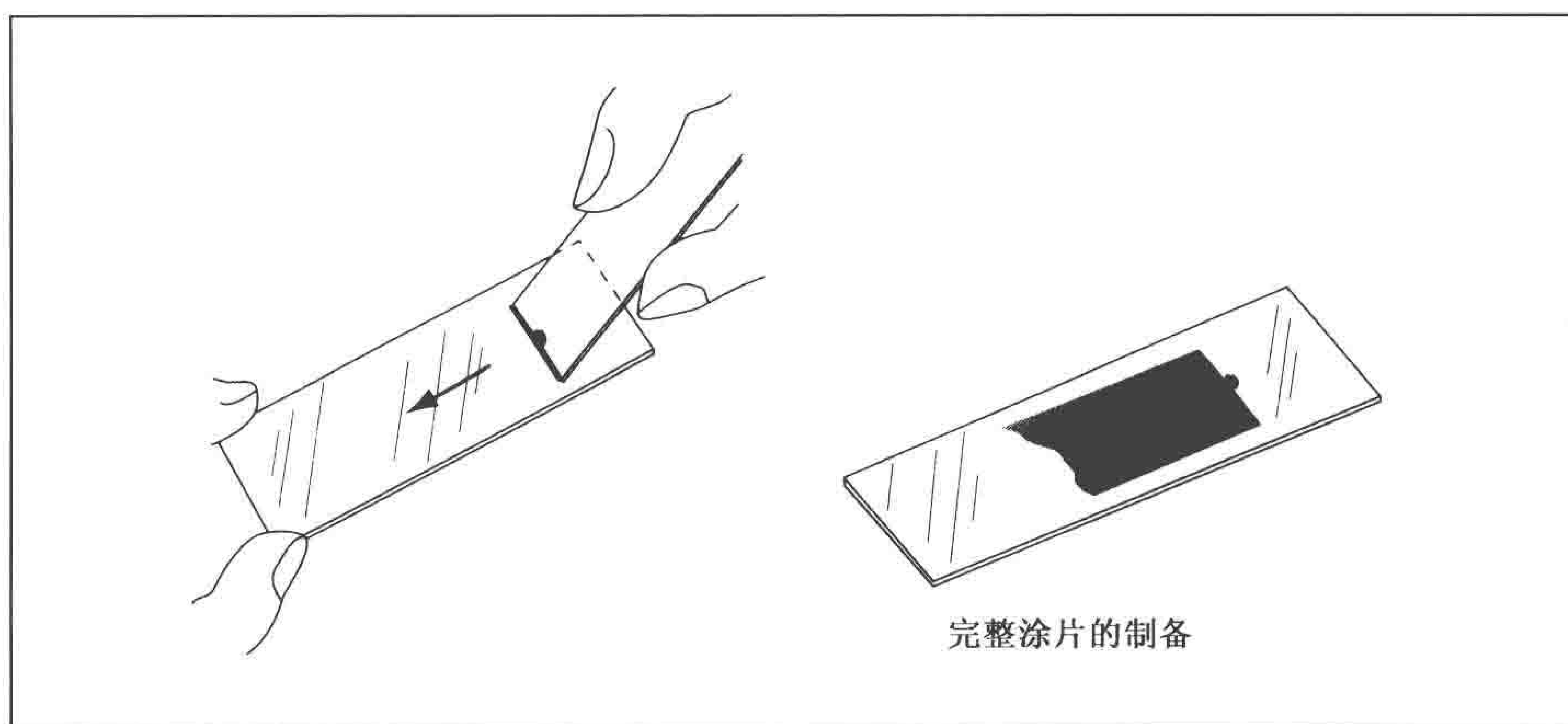


图 4.7.7　涂片制备的图示。

材料

肝素抗凝的血液和骨髓

0.01mol/L HCl

37℃含 0.1～1mg/ml 胃蛋白酶的 0.01mol/L HCl

乙醇清洁的玻片

1. 将一滴肝素抗凝的血液或骨髓滴在玻片的右缘。
2. 取第二张玻片（涂布器）置于液滴的左缘。
3. 将涂展玻片成40°角接触液滴使液滴沿着边缘展开。
4. 向左推动玻片使液滴铺展在第一张玻片上。
5. 室温下空气干燥玻片1～2h。
6. 应用原位杂交对涂片进行基因型分析，除去表型的染色（基本方案1，第12步）按照以下预处理：

   37℃ 0.1mol/L HCl孵育10min；

   37℃ 0.1～1mg/ml胃蛋白酶的0.01mol/L HCl孵育10～30min；

   用水洗3次。

   每次用一张玻片以确定最优化的酸处理时间和胃蛋白酶浓度及处理时间。
7. 执行原位杂交（基本方案1，第14步前）应用重复序列或单拷贝探针。

基本方案2　G显带后的染色体原位杂交

G显带处理或标准的细胞遗传学处理都能被应用于原位杂交。全染色体涂染探针是经常被肿瘤细胞遗传学和有标记染色体或是复杂染色体异常表达的产前诊断选用的探针。质粒和α卫星（着丝粒）重复在这些例子中不被用到，在作者手中，还未曾对G显带后的原位杂交有好的结果。仅有重复序列探针的杂交信号被用于酶的检测；单拷贝、重复序列和全染色体涂染探针能应用荧光检测。这些操作方案能应用于小于一周老化时间的未封片的标本或室温下保存超过10年Entellan封片的标本。

材料（标√的条目参见附录1）

- 未封片或Entellan封片G显带的中期细胞（备选方案3或单元4.3）
- 二甲苯
- 浓度梯度乙醇：70%、95%、100%乙醇
- √丙酮/甲醇固定剂，4℃
- 2×SSC（附录1）/0.2%（V/V）Tween，42℃
- 全染色体涂染探针（单元4.4）
- Coplin缸

1. 室温下将玻片浸在二甲苯中，如有必要（如玻片已被保存数周或更长时间），浸泡玻片1～4周除去盖玻片。
2. 在100%、95%、70%乙醇中各孵育5min，室温空气干燥10min。
3. 在装有甲醇丙酮固定剂的Coplin缸中4℃浸泡1min。
4. 冷自来水下冲洗，室温空气干燥12h。
5. 2×SSC/0.2%（V/V）Tween，42℃洗3次。每次10min，在热（37～40℃）自来水中冲洗5min。室温空气干燥10min。
6. 在70%、80%、90%和100%乙醇中各孵育5min。室温空气干燥10min。
7. 全染色体涂染探针执行原位杂交（基本方案1，第13步前）。

参考文献：Fletcher *et al.*，1991；Knuutila et al.，1994

编　者：Sakari Knuutila

单元 4.8　比较基因组杂交

基本方案 1　应用直接标记 DNA 比较基因组杂交

该方案在图 4.8.1 中已列出大纲。直接标记的探针较间接标记的探针背景较低。

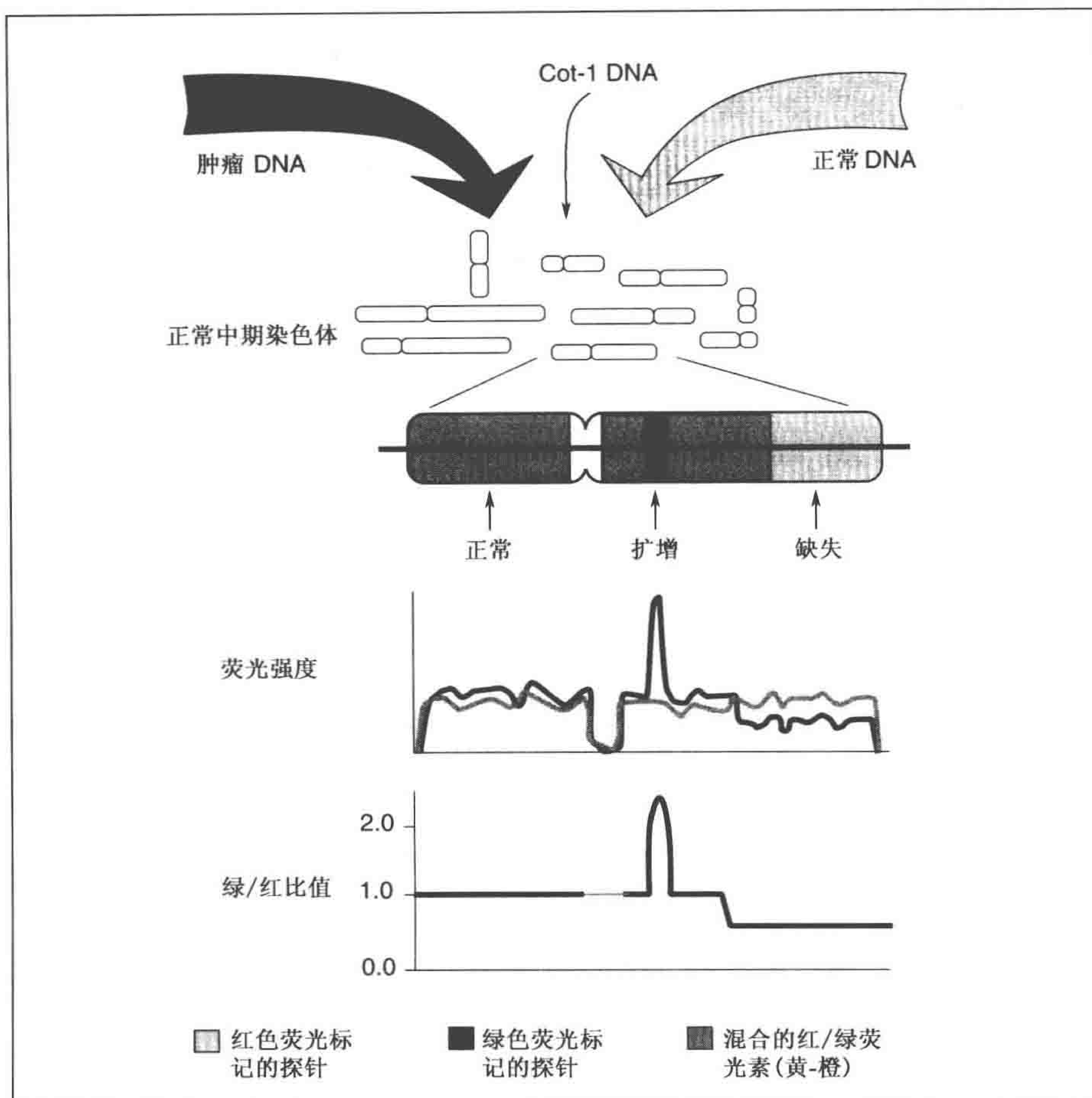


图 4.8.1　比较基因组杂交（CGH）。肿瘤 DNA（绿色荧光标记）和正常的参照 DNA（用红色荧光标记）在 Cot-1 DNA（抑制与 DNA 联结的重复元件）的存在下与正常人的染色体铺片杂交。如果有 DNA 的扩增在目标染色体相应区域就可见到绿色荧光强度增加；如果有 DNA 的缺失则红色荧光增加。当肿瘤 DNA 与参照 DNA 两者拷贝数相同则在那些染色体相应的区域红绿荧光相当。1.0 的比率表示无拷贝数的改变。绿色荧光比率高（>1.0）表示有扩增，绿色荧光比率低（<1.0）表示缺失（Kallioniemi *et al.*，1993；Academic Press 允许再印刷）。

材料（标√的条目参见附录 1）

20μg/ml 荧光素标记的待测探针 DNA（如肿瘤的基因组 DNA；支持方案 3）
20μg/ml 德克萨斯红标记的参照 DNA（正常人基因组 DNA；支持方案 3）
1μg/μl Cot-1 DNA（Life Technologies）
√3mol/L 乙酸钠，pH5.2
70%、85%（V/V）乙醇（室温）和 100%乙醇（冰上预冷和室温）
√主要的杂交溶液
正常人染色体铺片（单元 4.1；也可参见支持方案 1）
√变性液
√蛋白酶 K 溶液
√杂交片洗液，45℃和室温
√2×SSC，45℃和室温
√PN 缓冲液
√DAPI 的抗淬灭溶液
玻璃刀
45℃、70℃、75℃水浴箱
37℃玻片加热器
$18mm^2$ 和 $22mm^2$ 的盖玻片
橡皮胶带
湿盒：空的装移液管的容器使它保持湿润或等效的容器

注意：染色体铺片的质量是实验成功的重要参数，最好经常制备一大批铺片并且根据经验优化所有参数，包括每批铺片的储存条件。

1. 取 1.5ml 微量离心管：
   10μl 20μg/ml 荧光素标记的待测探针 DNA；
   10μl 20μg/ml 德克萨斯红标记的参照探针 DNA；
   20μl 1μg/μl 人 Cot-1 DNA。
2. 加入 1/10 体积的 3mol/L 乙酸钠，pH5.2 混合，2.5 体积的无水乙醇沉淀，4℃最大转速离心 30min，如结果杂交信号过弱，可增加待测和参照 DNA 的量。
3. 去除上清液，吸干管壁上多余的液体，小心避免触及沉淀物。空气干燥 10min。
4. 加入 10μl 主要杂交溶液，用移液器小心将沉淀混匀，振荡，最大转速离心 10s 使液体在管底，室温下溶解沉淀物，执行第 5～9 步。
5. 在染色体铺片背面用钻石笔将相应区域标记出，如需要，通过呼气使染色体区域更清楚可见。
6. 预热变性液至 73℃，将 Coplin 缸置于 75℃水浴箱中（检查缸内的温度）。在 37℃玻片预热器上至少 2min，将铺片（一次不得超过 3 或 4 片）置于 73℃变性液中，孵育 2.5～10min，确定每一批铺片的最佳变性时间。
7. 连续在室温下 70%、85%和 100%乙醇中脱水，每次 2min，垂直在空气中干燥。
8. 任意选择：室温下在蛋白酶 K 中 5～7min，重复第 7 步。用较长时间降低背景并增

强探针的渗透。用较短时间（或完全跳过）保证染色体形态和带纹。

9. 将铺片置于37℃玻片加热器。变性探针混合物70℃ 5min，随后（铺片仍在加热器上）迅速将10μl探针混合物加在铺片的染色体区域。用18mm²的盖玻片覆盖，用镊子轻压盖玻片去除气泡。用胶布将盖玻片边缘封闭。
10. 37℃湿盒杂交2～3d（最好>36h；在杂交液未干燥时，杂交可以大于3d）
11. 揭去胶布并小心除去盖玻片，45℃，3缸杂交洗液中各洗10min，也可在揭去胶布后，在第一次洗片时随盖玻片浸入洗液中。
12. 45℃的2×SSC洗10min，室温2×SSC洗10min。
13. 室温下PN缓冲液中洗两轮，各洗5min，室温下双蒸水洗两轮，洗5min。空气干燥。
14. 加8μl DAPI复染，盖上22mm²的盖玻片4℃保存2～3周。
15. 检查并分析（基本方案2）。

备选方案　应用间接标记DNA比较基因组杂交

间接标记探针的比较基因组杂交比应用直接标记的方法在荧光强度上能更广泛地显示变异，二级检测需要附加的方案和试剂。然而这些缺点可以弥补直接偶联核苷酸昂贵的价格。

附加材料（见基本方案1，标√的条目参见附录1）

20μg/ml生物素标记的待测组DNA（如全基因组肿瘤DNA；支持方案3）
20μg/ml地高辛标记的参照DNA（正常全基因组DNA；支持方案3）
封闭溶液：4×SSC/1%（*m*/*V*）BSA
√检测溶液
√4×SSC
4×SSC/0.1%（*V*/*V*）Triton X-100
24mm×50mm盖玻片

1. 准备探针混合物（基本方案1，第1步）将生物素标记的待测组DNA替代荧光素标记的待测探针DNA，地高辛标记的参照DNA替代德克萨斯红标记的参照探针DNA。
2. 制备探针和分裂中期染色体，执行杂交（基本方案1，第2～12步）
3. 将玻片在封闭溶液中室温下孵育5min。
4. 吸干玻片上多余的液体，但不能使玻片干脱水。加100μl检测溶液在染色体区域，将24mm×50mm盖玻片覆盖在载玻片上使它浮在液滴上，室温下孵育60min。
5. 室温下在4×SSC洗片10min，在4×SSC/0.1%（*V*/*V*）Triton X-100洗片10min，然后又在4×SSC洗片10min。最后将玻片浸在双蒸水5min，洗两轮，空气干燥。
6. 复染并检测玻片（基本方案1，第14和15步）。

支持方案1　比较基因组杂交中期染色体铺片的制备

最好应用来自男性捐献者制备的中期染色体铺片，与肿瘤或参照DNA的性别无

关。能很好地应用于着丝粒或特异序列探针的 FISH 的玻片可能并不适合于 CGH。如果 CGH 应用常规方法制备的染色体铺片不能达到很好的效果（单元 4.1），尝试以下的修改方案。

1. 在 PHA 作用（单元 4.1，基本方案，第 3a 步）过程中，将孵育时间设为 72h。
2. 为了达到同化目的（单元 4.1，基本方案，第 4 步），在氨甲蝶呤添加后孵育 17h。180g 离心 8min 以除去氨甲蝶呤（加入脱氧胸腺嘧啶苷前），去除介质，加入 5ml HBSS。重复一次去除 HBSS。在加入脱氧胸腺嘧啶苷后孵育 5h。
3. 在秋水仙胺作用（单元 4.1，基本方案，第 5 步）过程中，增加秋水仙胺的量使终浓度为 0.1μg/ml 并且设孵育时间为 10min。
4. 在低渗处理（单元 4.1，基本方案，第 6 步）过程中，使用之前制备新鲜的 75mmol/L KCl 并孵育 20min。
5. 在第一次固定（单元 4.1，基本方案，第 7 步）过程中，在继续执行下一步前使沉淀于 4℃在固定剂中孵育 30min。
6. 固定过程（单元 4.1，基本方案，第 10 步），重复固定并离心 4～6 次。
7. 在制备大批铺片之前首先要检查它的质量，将一滴悬液滴在乙醇清洁过的干净玻片上，玻片至少要用不含棉绒的无尘纸擦拭过一次并平放在实验操作台上。在相差显微镜下检查。制备较好的染色体铺片具有低细胞密度、较分散的中期相、几乎无细胞质和碎屑。
8. 当铺片制备（单元 4.1，支持方案）完成后，执行 CGH 实验前，－20℃液氮密闭罐中至少保存 2～3 周。
9. 应用蛋白酶 K 处理的或不用蛋白酶 K 处理的铺片执行标准的 CGH 实验并检测，以确定最佳的变性时间和蛋白酶 K 处理时间。

支持方案 2　用于 CGH 的基因组 DNA 的制备

对于成功的 CGH 实验，来自健康捐献者的和来自被研究的肿瘤组织的高分子质量的基因组 DNA 是必备的。待测的和参照的 DNA 必须与捐献者的性别相匹配，而不需要来自同一个患者。参照 DNA 来源于血液（附录 3A，单元 10.3）或哺乳动物组织（CPMB 单元 2.2）。待测（肿瘤）DNA 来源于临床标本（单元 10.4）或细胞系（附录 3A）。

对于 CGH 实验，DNA 的纯化不像其他实验一样重要，但要尽量避免使用降解的 DNA，因为这会使得 NICK 平移后的探针片段太小。

当评价用 CGH 分析的肿瘤样本时，非常关键的是肿瘤标本中必须含有大于或等于 50%的肿瘤细胞。可以通过苏木素或伊红染色检测肿瘤组织冰冻切片，确定含有肿瘤组织的区域，并将正常组织切除来增加肿瘤样本中肿瘤细胞的数量。

支持方案 3　用于 CGH 的标记 DNA 探针的制备

材料

√10×核苷酸混合物

用于参照 DNA 标记的 dUTP：1μg/ml 德克萨斯红-5-dUTP（直接标记；Du Pont

NEN）或地高辛-11-dUTP（间接标记；Boehringer Mannheim）

用于待测（肿瘤）DNA标记的dUTP：1μg/ml荧光素-12-dUTP（直接标记；Du Pont NEN）

用于待测（肿瘤）DNA标记的dATP：生物素-14-dATP（间接标记）在BioNick 10×dNTP混合物中（Life Technologies）

待测（肿瘤）和正常（参照）基因组DNA（支持方案2）

5～10μl DNA聚合酶Ⅰ（Life Technologies）

BioNick 10×酶混合物（Life Technologies）

1%琼脂糖胶

15～70℃水浴箱

1a. 应用耦合的dUTP标记：按以下顺序在置于冰上的0.5ml微离心管中加入Nick平移试剂：

5μl 10×核苷酸混合物；

1μl 用于待测和参照DNA标记的dUTP（终浓度为1nmol）；

1μg 待测或参照DNA；

加入水使终体积为50μl；

1μl 5～10U/μl DNA聚合酶Ⅰ（终浓度0.1～0.2U/μl）。

3μl BioNick 10×酶混合物（依照DNA质量和反应后片段大小调整用量）。

1b. 应用生物素-14-dATP标记：按照第1a步中准备反应，用5μl含生物素-14-dATP的BioNick 10×dNTP混合物取代核苷酸混合物，删去用于标记的dUTP。

2. 充分混合，短暂离心，15℃反应45～90min（依靠DNA质量优化反应时间，一般用60min）。

3. 70℃加热10min停止反应，取7μl反应混合物非变性1%琼脂糖胶电泳，EB染色，UV观察并估计片段长度（最佳长度为300～3kb）。

基本方案2 显微镜检查法、成像、用于CGH的图像分析

直接的视觉观察被用于CGH杂交的初期评价并且能提供染色体改变的初步解释，应用装配有相应激发光源、滤片、63×或100×油镜镜头的荧光显微镜观察CGH杂交的中期分裂相。DNA序列拷贝数的改变决定于每一条染色体上相应红/绿荧光强度的改变。两种相关荧光强度的差别能通过双通道滤片与复染的DAPI同时被传送红绿荧光。染色体上大片段的缺失将显现红色，而大片段的扩增则显现为绿色。较小的明亮绿色荧光区域在基因扩增大于5～7fold时能被检测到。在相对拷贝数正常的染色体区域将出现黄或橙的颜色。小区域的扩增或缺失（<10～20Mb）人的肉眼无法直接观测到。这些改变更依赖于对荧光强度比值的测量，而这只能通过数字影像分析。高质量的CGH显示较好的DAPI带纹，延染色体均匀分布的红绿荧光，并且仅有最小的背景染色。

高分辨的量的信息来源于数字影像。因为CGH分析是一个相对较新的技术，很多成功的CGH分析系统在实验室里已取得了一定的发展。仅有很少的公司（Apllied Imaging、MetaSystems、Oncor Image Systems、Vysis）生产了应用于商业的系统，并且声称该系统能够进行CGH分析。这些系统混合着巨大的变化，并且经历着演变，因此

在购买这些系统时要确定它是否具有所需要的功能。

对于每一次实验，选择3～5个中期相。①最佳的分裂相染色体几乎无严重的弯曲，无接触，无重叠；②最少的背景染色；③相对平滑，无颗粒状；④每一分裂相中最少的染色体交叉浓缩改变。

CGH的特异性依赖于反转杂交所有改变的确定（如用反转标记的探针重复杂交）。当绿红比值与标准的和反转杂交的比较时，拷贝数的改变将是相反的方向。正常的杂交将被作为每一个样本的对照，着丝粒和异染色质区与着丝粒周围短臂区，被排除在外，不能用CGH结果解释，必须注意GC含量丰富的1号短臂、19和22号染色体。这三条染色体区域同所有染色体着丝粒和异染色质区，它们给出错误的比值改变如果杂交条件不够优化时。来自每一染色体至少4个拷贝的数据能被分析。对关于影像分析和数据解释的变动方面的后续讨论，见CPHG单元4.6。

参考文献：DuManoir et al.，1995；Kallioniemi et al.，1994

编　者：Sandy DeVries，Joe W. Gray，Daniel Pinkel，Frederic M. Waldman and Damir Sudar

第5章　大片段的克隆和分析

本章介绍了许多大片段克隆和分析技术的操作规程。这些方法包括分离基因组中区域以构建重叠的大片段克隆（YAC、BAC、PAC）及这些克隆的操作方法。在本章中，大片段克隆是指包括任何能携带超过40kb以上的人DNA插入子的宿主-载体系统。

长片段限制性图谱的制作（单元5.1）使得不需要克隆错位点之间的DNA就能分析出其部分特点。这一方法不再只用于绘制人类基因组的物理图谱，它可用于分析其他一些尚缺乏克隆来源的基因组。当基因组界标之间的DNA序列还没有分离到重叠克隆重叠时长片段限制性酶谱适合确定基因组的界标之间的距离等，作为基因表达的标志——CpG岛的位置也能得以确定。

目前已构建了多种全基因组大片段克隆文库，有几个公司提供筛查服务，DNA探针池、高密度阵列筛选、文库，以及单克隆。筛查也可作为通过与拥有DNA探针池和大片段克隆的研究组进行合作来完成。许多研究人员希望能从他们感兴趣的生物体中构建大片段克隆文库，本章单元5.4中就介绍了BAC文库的构建方法。

大片段插入的BAC和YAC能从很多方面进行分析。首先，对克隆或部分克隆进行筛查、标记、片段化、进行PCR扩增以确定标记部分。第二，把克隆或克隆的部分作为探针来进行染色体行走，用FISH确定插入子在染色体中的位置，或确定该染色体区域所编码的cDNA。在任何情况下，DNA的准备总是必需的。当YAC不能提供足量的DNA时，有许多方法能为PCR扩增提供足量的DNA。BAC的DNA能采用标准的碱裂解方法从内源性的大肠杆菌染色体DNA中分离出来，该方法与用于质粒DNA和黏粒DNA制备的碱裂解法相似。这些方法能为彻底限制性酶谱和鸟枪法测序等实验提供充足的DNA。另一方面，得到纯化的YAC的DNA则难得多。YAC是以单拷贝的形式存在于酵母的染色体组中，而且酵母细胞的量在过夜培养后比大肠杆菌的细胞量要少得多。在单元5.1中介绍了运用琼脂糖阻断的DNA制备方法来制备大分子质量的DNA。

目前用于筛查大片段文库的一个基本方法是利用滤膜杂交单元5.2检测包含标记序列的克隆。制备YAC（或BAC）的滤膜并不困难，但如果要在超过400 000个克隆的多寡基因组文库中进行平行实验就需要相当多的时间和设备。这些滤膜可从一些资源中心和商业化公司方便地获得。

单元5.3中介绍了将retrofitted YAC转入到哺乳动物细胞中。利用重组的几种YAC，并带上哺乳动物细胞筛选标记，就有可能将较大的基因组区域（包括未改变的区域和进行了插入、缺失等突变的区域）插到入到哺乳动物细胞中，从而研究位于比较大的区域中的基因的功能。

编　者：Donald T. Moir and Douglas R. Smith

单元 5.1　大范围限制性图谱：脉冲电场电泳

这一单元介绍了获得基因组 DNA（>500kb 至>5Mb）限制性图谱的方法，可用于分析插入大片段的克隆。

注：所有与活细胞接触的试剂和器材都必须灭菌。

基本方案　构建基因组区域的长距离限制性图谱

材料（标√的条目参见附录 1）

Agarose-embedded DNA 样品（支持方案 1）
稀有的限制性内切核酸酶（表 5.1）和 10×缓冲液
1mg/ml BSA、乙酰化和去核酶处理
100mmol/L 亚精胺盐酸
√TE 缓冲液
琼脂糖（超纯）
√10℃的电泳缓冲液（0.5×TBE）
√6×载样液
DNA 长度标准（支持方案 2）
√0.5μg/ml 溴化乙锭
100mm petri 板
适合限制性酶切温度的水浴
脉冲电场电泳设备（具有冷却选择装置，如 Bio-Rad 系统）
恒定电压
脉冲发生器
带正电荷的尼龙膜

1. 将包埋在琼脂糖中的 DNA 样品放置到一个 petri 板中，然后将其切成 8 个大约 25μl 的小块（1mm×4mm×6mm），每块含大约 3μg DNA ，要小心处理样品以避免损伤而导致条带扭曲。
2. 将一个微量离心管置于冰上，将以下的物品混合（总体积为 100μl，包括琼脂糖块）：
   10μl 10×限制性内切核酸酶缓冲液；
   10μl 1mg/ml 乙酰化 BSA；
   4μl 100mmol/L 亚精胺盐酸；
   50μl 灭菌水。
   将一个琼脂糖块放置于反应混合液中，冰浴 5min。
3. 加 15U 的稀有限制性内切核酸酶入内，混合，冰浴 60min 以使限制酶能扩散到琼脂糖基质中。
4. 将管子置于合适的温度中（表 5.1.1 或产品说明）水浴 5h。对于 50℃的反应温度

（如 *Bss*HⅡ，*Sfi*Ⅰ 等），应滴加几滴矿物油覆盖反应混合液以防止蒸发。

表 5.1.1 高度特异性的限制性内切核酸酶位点及其最适反应温度

限制性内切核酸酶	酶切位点[a]	最适反应温度/℃
*Asc*Ⅰ	GG↓CGCGCC	37
*Bss*HⅡ	GC↓GCGC	50
*Cla*Ⅰ	AT↓CGAT	37
*Eag*Ⅰ	C↓GGCCG	37
*Mlu*Ⅰ	A↓CGCGT	37
*Nae*Ⅰ	GCC↓GGC	37
*Nar*Ⅰ	GG↓CGCC	37
*Not*Ⅰ	GC↓GGCCGC	37
*Nru*Ⅰ	TCG↓CGA	37
*Pac*Ⅰ	TTAAT↓TAA	37
*Pae*R7Ⅰ	C↓TCGAG	37
*Pme*Ⅰ	GTTT↓AAAC	37
*Pvu*Ⅰ	CGAT↓CG	37
*Rsr*Ⅱ	CG↓G（A/T）CCG	37
*Sac*Ⅱ	CCGC↓GG	37
*Sal*Ⅰ	G↓TCGAC	37
*Sfi*Ⅰ	GGCCN_4↓NGGCC	50
*Sgr*AⅠ	CPu↓CCGGpyG	37
*Sma*Ⅰ	CCC↓GGG	25
*Srf*Ⅰ	GCCC↓GGGC	37
*Sse*8387Ⅰ	CCTGCA↓GG	37
*Swa*Ⅰ	ATTTAAAT	25
*Xho*Ⅰ	C↓TCGAG	37
*Xma*Ⅲ	C↓GGCCG	37

a 缩写词：N，任意核苷酸（G，A，T，C）；Pu，嘌呤（G 或 A）；Py，嘧啶（C 或 T）；A/T，A 或 T。

5. 将酶切反应液稀释于 1ml 的 TE 缓冲液中以终止消化。如果样品不立即使用，可将其置于 4℃冷藏（样品能保存数月）。
6. 对于双酶切，可将第一种限制酶的酶切反应缓冲液置于室温的 TE 缓冲液中 30min。然后移去 TE/限制酶缓冲液，采用第二种限制酶重复第 2～5 步。
7. 制备一块适合 PFGE（puls-field gel electophoresis，脉冲电场电泳）设备的胶。将胶放到平台上，将其弄平以避免条带的扭曲。

   在高浓度的琼脂糖胶（如 1.0%和 1.5%）中，DNA 分子移动较慢但条带齐整。一般而言，1%的胶可分离的 DNA 可达到 3Mb，而 1.2%和 1.5%的胶可用于提高 DNA 条带的强度。对于特别大的 DNA 分子（如>2Mb），通常采用 0.5%～0.9%的胶。一块染色体级的琼脂糖胶应有最好的分离效果。
8. 加 20μl 的 6×载样液至样品管中，计划一下样品在胶中的位置，将要进行直接比较的样品点在相邻的胶孔中（由于采用 PFGE 分离时几乎总是出现一些扭曲），同时，

DNA 长度标准应散布于胶中以助于分析 DNA 长度。

9. 小心地移动梳子，先将 0.5×TBE 缓冲液注满胶孔，用两个小胶铲将 DNA 样品引入到胶孔中，其中一个放置样品，用另一个打开胶孔以使样品能滑进去（要确保胶块底部没有产生气泡，以免 DNA 在移动过程中产生扭曲）。
10. 将胶放到 PFGE 设备中，加入 2.5L 0.5×TBE 缓冲液，可将缓冲液预冷到 10℃，或采用制冷装置循环缓冲液，或将电泳设备置于冰箱中。
11. 盖上胶盒的盖子（如 Bio-Rad 系统）后就自动接通电源。对常规的分离要求和系统而言，常采用 5V/cm 的电场强度，90s 的脉冲时间，电泳时间为 48h（或参照设备说明书）。
12. 当分离电泳完毕，关掉电源，排掉缓冲液，将胶放置含 0.5μg/ml 的溴化乙锭溶液中染色 2～24h，染后拍照。
13. 将用 PFGE 分离的 DNA 转移的带正电荷的尼龙膜上。为了从 PFGE 获得的大片段 DNA 的最佳转移，可采用酸去嘌呤的步骤，采用变性转移液和紫外线切割。
14. 将膜与用放射元素标记的探针杂交及放射自显影。使用没使用重复元件和载体序列的探针（或者与未标记的基因组 DNA 预先退火，阻断它们的杂交）。

支持方案 1　制备包埋有高分子质量的哺乳动物细胞基因组 DNA 的琼脂糖块

此方案适用于大部分来源于哺乳动物细胞的活细胞，因为这些细胞能制成单细胞悬液，也可用于将组织解离而得到活细胞。尽量不要使用冻存的细胞，除非没有其他的 DNA 来源，因为冻融的过程会影响样品的质量。

材料（标√的条目参见附录 1）

1.0%（*m*/*V*）低熔点胶，置于 HBSS 中
哺乳动物细胞
√HBSS，37℃
√细胞裂解液
√TE 缓冲液
√PMSF/TE 洗涤缓冲液（新鲜配制）
50℃和 42℃水浴
阻隔模子（如 Bio-Rad 的阻隔模子，许多 PFGE 系统都能提供）
Beckman GPR 离心机（带有 GH-3.7 的转子）

1. 将装有适量的 1.0%的低熔点琼脂糖胶的管子放到装有一半水的烧杯中，加热烧杯刚好达到溶解低熔点琼脂糖胶的温度，注意要确保琼脂糖中的水不丢失，溶解后马上将其置于 50℃的水中降温。
2. 用 70%的乙醇清洗阻隔模子，组装好后，然后将其置于碎冰中预冷（也可见产品手册）。

   Bio-Rad 的阻隔模子能形成容量为 225μl 的胶孔，按基本方案中介绍的方法切成 1mm×4mm×6mm 的胶块。每一胶块约含 3μg DNA。对于四倍体或多倍体的细胞，就要根据实际情况调整到 3μg DNA，而不能过量。

3. 室温 150*g*（Beckman GH-3.7 转子：800r/min）离心 8min 收集细胞。弃上清，用 10ml 37℃的 HBSS 重悬细胞，混匀后制成单细胞悬液。用血细胞计数器对细胞计数（附录 3I）。
4. 用 HBSS 重悬、离心细胞来洗涤细胞 2 次。计算出使细胞浓度达到 4×10^7 个/ml 的细胞重悬体积。用比计算出的体积稍微少一点的 HBSS 重悬细胞，将其小心吸入另一个管子中，测量其实际体积。然后补加 HBSS 至所计算出的体积。
5. 将已融的琼脂糖从 50℃水浴移到 42℃水浴（不需严格平衡）。将装有细胞的管子也置于 42℃水浴，加入相同体积的 42℃的琼脂糖，混合。将细胞/琼脂糖悬液置于 42℃。
6. 吸取 225μl 的细胞/琼脂糖悬液至每一个已预冷的阻隔模子中。可将模子置于冰上 5min 固化。用两个小铲将胶块移到装有 20ml 细胞裂解液的管子中（足够放入 10 个 225μl 的胶块）。将其置于 50℃温育 24h。
7. 倾弃裂解液，再加入 20ml 的新鲜的裂解液，在 50℃再温育 24h。
8. 透析胶块 2 次，每一次使用 40ml TE 缓冲液，室温，1h。轻柔地翻转几次管子。最后一次是在 50℃中按同样的方法透析。
9. 用新鲜配制的 PMSF/TE 洗涤液代替 TE 缓冲液，然后置于 50℃中温育，重复一次。
10. 用 PMSF/TE 代替新鲜的 TE 缓冲液，将胶块置于 10℃保存。

支持方案 2　用啤酒酵母染色体和 YAC 制备包埋在琼脂糖块中的高分子质量标准品

啤酒酵母（*S. cerevisiae*）拥有 16 条长度从 200～2000kb 的染色体，这样为 PFGE 提供了方便的 DNA 长度标准。

材料（标√的条目参见附录 1）

啤酒酵母（*S. cerevisiae*）细胞
√YPD 平板和培养基或 AHC 平板和培养基
√50mmol/L EDTA，pH 7.5
70%乙醇
√SCE 缓冲液
Zymolyase 溶液：100U/ml 的 Zymolase 100T（干粉；ICN Biomedicals）/100mmol/L mercaptoethanol（2-ME），溶于 SCE 缓冲液
2-ME 溶液：70mmol/L 的 2-ME，溶于 SCE 缓冲液
√细胞裂解液
√TE 缓冲液
30℃温箱
30℃水浴摇床
250ml 离心瓶
Sorvall 离心机，带有 GSA 转子（或相当的离心机及转子）
50ml 的圆锥形离心管，带螺旋式的管盖

树脂的阻隔模子（Bio-Rad）

带 GSA 转子的 Beckman 离心机（或相当的离心机及转子）

42℃和 50℃水浴箱

1. 取 *S. cerevisiae* 菌种在 YPD 平板上划线以备挑取单克隆细胞。30℃孵育 1～2d。如果要从携带 YAC 的酵母株中获得染色体，就用至少能筛选出一个 YAC 臂的培养基代替酵母培养基，如 AHC 平板和培养基用于带有 URA3 和 TRP1 的 YAC。
2. 挑取一单克隆至一个装有 5ml 的液体培养基的无菌管中，在 30℃通风良好的条件下培养过夜。
3. 接种 2ml 过夜培养物到装在 500ml 灭菌瓶中的 200ml 培养基中，在 30℃通风良好的条件下培养过夜。
4. 将培养物移到 250ml 的离心瓶中，室温 5800*g*（相当于 Sorvall GSA 转子 6000r/min）离心 10min，收集细胞。
5. 用 15ml pH 7.5，50mmol/L 的 EDTA 重悬细胞，然后移至一 50ml 的圆锥形带螺旋盖子的离心管中，用细胞计数器计数细胞，用 50mmol/L 的 EDTA 进行稀释以调整细胞浓度。
6. 用 70%的乙醇清洗阻隔模子，组装好后，然后将其置于碎冰中预冷。
7. 室温离心细胞，900*g*（相当于 Beckman 的 GH-3.7 转子 2000r/min）。用适量的 zymolyase 溶液重悬细胞，调整其浓度为 4×10^9 个/ml。
8. 将 1.4%的低熔点琼脂糖溶化后放入 50℃的水浴中冷却。
9. 取 1ml 的细胞重悬液（4×10^9 个）到一 15ml 的管中，42℃水浴。加入 1ml 的已融的琼脂糖，混匀，继续水浴。
10. 将细胞/琼脂糖混合液加入置于冰上的阻隔模子中，放置 5min 以固化。将模子中的胶块移到 20ml 的 2-ME 溶液中，37℃温育过夜。

    一个 225μl 的胶块会形成一个 1mm×4mm×6mm 的样品块，细胞浓度为 2×10^9 个/ml，DNA 的最终浓度约为 33μg/μl。
11. 倾去溶液后换成 30ml 的细胞裂解液，50℃温育过夜。
12. 检查白色、不透明的胶块是否变得透明了（如变透明就说明大部分的细胞已裂解）。换成新鲜的细胞裂解液，继续放置 50℃中温育过夜。
13. 裂解完毕后，往管中加满 TE 透析胶块，每隔 30min 至 1h 更换 TE，总共透析 4 次，最后往管中加满新鲜的 TE 缓冲液，连同胶块保存于 10℃。
14. 将胶块进行 PFGE（见基本方案），电场强度：5V/cm，脉冲时间：90s，电泳 36～48h。

支持方案 3　BAC DNA 的制备、限制性消化及电泳分析

材料（标√的条目参见附录 1）

√加了抗生素的 LB 培养基（抗生素浓度与培养细菌的固体培养基相同）

取大肠杆菌（*E. coli*）DH10B 在固体培养基上划线以挑取所要的 BAC 克隆/抗生素/EPTG（25μg/ml）/X-gal（50μg/ml）；通常用于一般的 BAC 载体的抗生

素的浓度是：氯霉素 12.5μg/ml，卡那霉素 25μg/ml

√GTE 溶液，冰上预冷

√NaOH/SDS 溶液

√乙酸钾（potassium acetate）溶液

异丙醇

70%的乙醇

√TE 缓冲液，pH 8.0

10U/μl 的 *Not* Ⅰ限制性内切核酸酶和缓冲液（NEB）

100×BSA（NEB）

√6×载样液

用 0.5%的 TBE 配制的用于电泳的 1%琼脂糖胶

DNA 长度标准（支持方案 2）

√0.5μg/ml 的溴化乙锭

15ml 管

37℃的摇床温箱

带有套桶转子的离心机

37℃水浴箱或温箱

Bio-Rad CHEF 部件（DR-Ⅱ、DR-Ⅲ或 Mapper），配有制冷器和泵

紫外灯盒子

1. 用一 15ml 管装 3ml 的有抗生素的 LB 培养基，从 DH10B 的划线平板上挑取一单克隆至其中，37℃摇床培养 16～18h（250r/min）。
2. 1770*g*（相当于有套桶转子 3000r/min）离心 10min，弃去上清液，加入 200μl 在冰上预冷的 GTE 溶液，重悬细菌，然后将其移入到一微量离心管中，加 400μl 的 NaOH/SDS 溶液入内，颠倒管子进行混匀，将管子置于冰上 7min。
3. 加 300μl 乙酸钾溶液入内，颠倒管子进行混匀，置于冰上 7min。以最高速度离心 20min。将上清液移至一新的 1.5ml 微量离心管中，如果还有残留的杂质，可再离心一次以去除杂质。
4. 加 600μl 异丙醇入内，颠倒管子进行混匀，置于冰上 20min。以最高速度离心 25min 将 DNA 沉淀下来。移去上清液，然后加入 1ml 的 70%乙醇，以最高速度离心 15min，完全去除 70%乙醇，将管子置于层流通风橱中风干 1h 或放置试验台上风干几小时。用 35μl pH8.0 的 TE 重悬 BAC DNA。
5. 配制消化 BAC DNA 的限制性酶切反应液，如需要可增加 DNA 浓度。如需要提高消化能力，可将限制性酶的浓度提高到 0.75～1μl。

   1.5μl *Not* Ⅰ 缓冲液；

   0.2μl 100×BSA；

   0.5μl 10U/μl *Not* Ⅰ；

   7.8μl 灭菌水；

   5.0 BAC DNA；

   总体积：15μl。

37℃酶切 5h 以上。酶切完毕后加 0.2μl 的 6×载样液以终止消化反应，在将其加到 CHEF 胶中以前将其保存在冰上。

6. 用 0.5%的 TBE 制备一 1%的琼脂糖胶，置于 50℃左右冷却。当胶固化后，加 DNA 长度标准到胶中（支持方案 2），用融化的琼脂糖封住胶孔。
7. 加 2.5L 预冷（14℃）的 0.5×TBE 到电泳槽中，将胶放入电泳槽中后，把 BAC 酶切样品连同载样染料加入到浸没在 TBE 中水平摆放的胶中。电泳条件如下。切换时间 5～15s，采用线性扫描电压，电场强度 6V/cm(200V)，电泳时间 15h。
8. 电泳完毕后，根据基本方案中方法用 0.5μg/ml 的溴化乙锭染胶，在紫外光的盒中检测胶。

   当观测 CHEF 胶时，插入的条带会较清晰，位于载体条带的上方，载体 pBeloBAC11 及其衍生载体的大小为 7.5kb 载体的条带在所有的泳道中都应看得见。人类的 BAC 中通常有一条超过 100kb 的插入条带，因为大部分人类 BAC 平均的插入片段长度在 100kb 以上。

9. 如何需要的话，可将胶中的 BAC DNA 根据 Southern blot 的方法转移，然后与探针杂交（基本方案中第 13 和 14 步）。

参考文献：Birren and Lai，1993；Gemmill，1990；Schwartz and Cantor. 1984；Smith，1990；Vollrath and Davis，1987

编　者：Robert M. Gemmill，Richard Bolin，Jeff P. Tomkins，and Rod A. Wing

单元 5.2　用杂交的方法筛选大片段插入的文库

基本方案 1　采用高密度和低密度阵列制备克隆和 DNA

由于原代的转化子只能产生数目有限的滤膜，因而随机铺板不适合滤膜的制备以及 YAC、BAC 和 PAC 文库的保存，而且由于克隆增殖率存在差别，因而无论是哪一种扩增形式都会将偏差带入文库中去。因此，原代的转化子应加入微孔板中，放置于－80℃保存。这使得制造分配用的文库拷贝变得简单易行，而且使组与组之间直接用阳性板子的地址进行数据扫描的交流更易进行。此外，微孔板的样式要适合手工和自动化地进行低密度和高密度的杂交膜的制备，包括采用一些带有多个金属和塑料尖头的设备来进行杂交膜的制备。这个基本方案介绍了制备膜的方法。

重复铺 YAC 转化板

这一步骤主要用于将连接到 YAC 载体中的大分子质量的基因组 DNA 转化到 *S. cerevisiae* 细胞中，这一过程需利用酶去除酵母的细胞壁。转化子较脆弱，必须在一个琼脂的支持层上生长。这样就不需要将 YAC 克隆挑至杂交膜上去了。解决这一问题的一个方法就是采用一个金属的挑克隆的设备（或金属的丝绒），这样可采用成千上万的针头将原代转化的琼脂板中突起的细胞转移到选择性琼脂板的表面。一个拥有 40 000 个针头的金属克隆复制机可从 ICRT 购得。琼脂层应尽可能的薄，这样就会随着在其上

的克隆的生长而变干，从而使复制机能更容易地接触琼脂上的克隆。复制机要用99%或95%的工业级别的乙醇浸泡消毒，然后通过燃烧去除乙醇。也可高压蒸汽灭菌 fabric velvets，但克隆在转移时会溅出得更多。

当克隆长出以后，可将一张干的尼龙膜放置到克隆上 15min，就可将克隆转移到膜上。然后克隆在原位被裂解而释放出 DNA 以进行杂交。可从初始转化平板印模一次得到几个平板的拷贝。过滤器推力可以由每块补救板材产生，并且正面克隆可以与其中一个琼脂拷贝分开。琼脂拷贝能在 4℃储存数周。如要冻存，可将有克隆的一面朝下放到一张冰冻的 Whatman 3MM 的滤纸上，这张滤纸须用含 30%甘油的 YPD 培养基浸泡过。将这张滤纸夹到聚碳酸板中，然后冻存于−70℃中。阳性克隆可从膜中剪出，然后将它们单独放到琼脂上以产生新的克隆。

不巧的是，滤膜的数目和每一张滤膜上克隆的数目有限，并且琼脂板和冻存的滤膜都不能给克隆提供理想的冻存条件。因此这些滤膜不适合大规模的基因组绘图实验，这些实验要求对同一克隆进行多次杂交，并需要简单易行的良好的保存克隆的方法。

如果要得到大量滤膜进行杂交以筛选 YAC 文库，就有必要将初始的转化平板上的 YAC 克隆挑出，然后将其接种到微孔板中。这些克隆可在含 20%甘油的条件下保存于−70℃。复苏这些克隆时可用非筛选性培养基（如 YPD 培养基）。

手工或利用机器制备低密度到中密度的克隆和滤膜

可采用手工的方法利用带有 96 个（384 个）实心（空心）针头金属（塑料）的设备制备低密度的 YAC、BAC、PAC 滤膜（图 5.2.1）。这些设备也可用于 YAC DNA 样品（从 YAC 克隆获得的酵母总 DNA，从 YAC 中获得的 Alu-PCR 产物、YAC 池）的排列，gidding 工具可从许多商业公司得到（如 V&P Scientific、Sigma、Nunc、Dynatech、Genetix、Techne）。

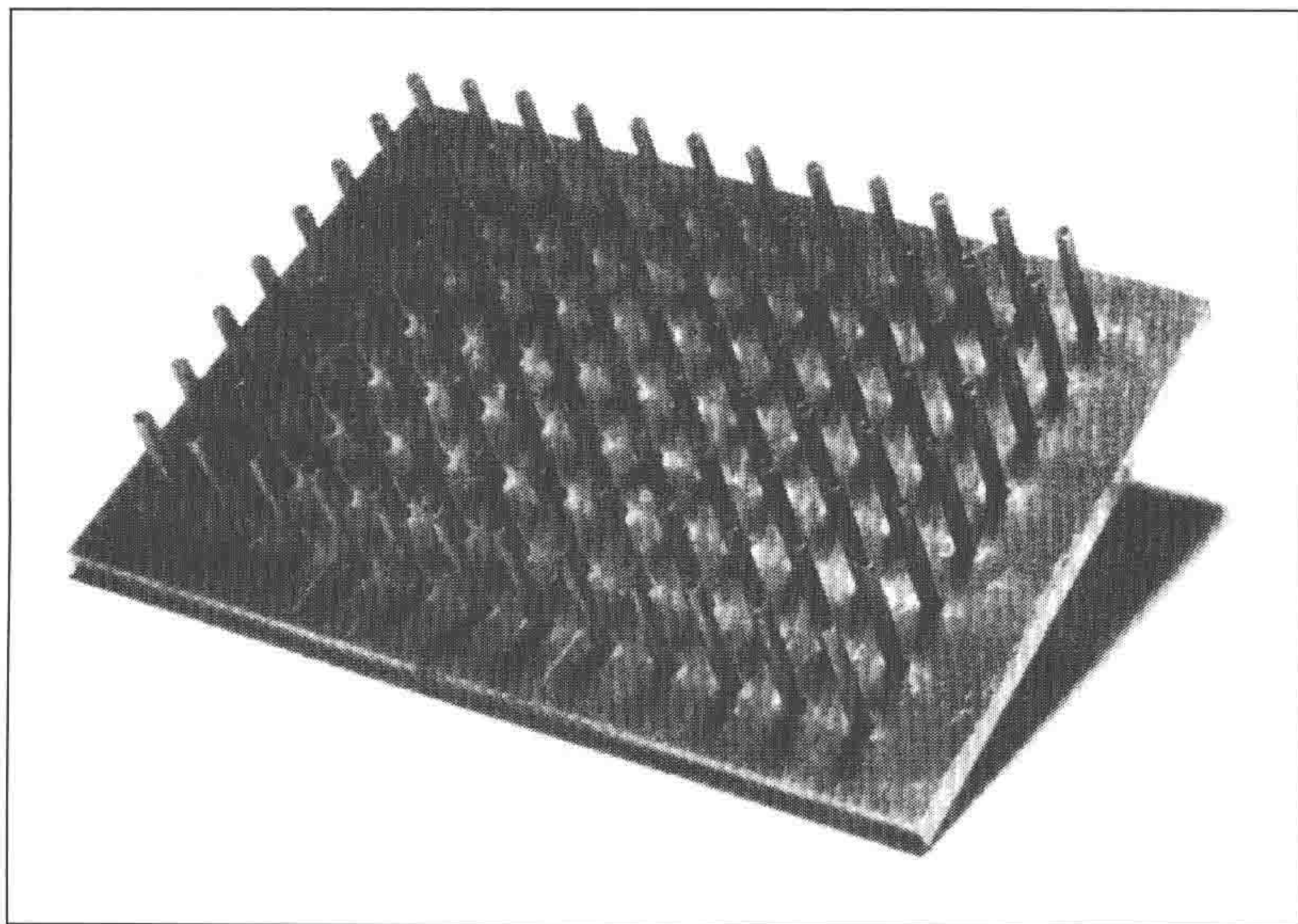


图 5.2.1 一个带有 96 个针头的金属装置，可用于微孔板中的接种和制备大量低密度的克隆。

根据阵列的样品的不同（DNA 或克隆），放置在阵列设备上的装置也有所不同。这是因为，哪怕很少的细胞都能形成克隆，尽管转移的细胞数是变化的，但并不会对最后的膜产生严重的影响，而如果加到每一个点中的 DNA 溶液的体积出现差异的话，就会直接影响到杂交信号的强弱。

在选择阵列 DNA 溶液的设备时，主要考虑的方面是所运送的体积、显示结果的点所占的区域大小、针头之间所转移溶液体积的变异性。空心针和塑料针能比金属实现针运送更多的体积。这有利于将 YAC 克隆接种到微孔板中以及运送 YAC 克隆的总 YAC DNA 的稀释溶液。然而具有较小运送体积的实心金属针头在运送相对浓度较高的 IRS-PCR 产物时显得更有效，因为其能够通过中等的体积得到较强的信号（从而能制备出更多的膜），而且其能适合提高点（spot）的密度。金属针的针头之间的变异性较低。如果需要更多的 DNA 以提供足够的信号，最好采用只能运送很少体积的针点样 3 次、4 次、5 次或更多次，这样所点的区域和所使用样品的体积可控制到最小限度。这些操作可利用带有用于阵列装置模板的自动化仪器完成（见下面）。

在使用一个 96 针或 384 针的复制机之前，要将其针浸泡于 95%的乙醇中灭菌。乙醇的深度要高于微孔板的深度。随后小心地将复制机在火焰上短暂地过一下，以便去处多余的乙醇。一些塑料的复制机可进行高压蒸汽灭菌。

多针头的复制机用于将微孔板中的细胞或 DNA 拷贝到尼龙膜上。没有电荷的尼龙膜（如 Hybond N、Amersham）或带正电荷的膜（如 Hybond N+、Amersham）能用于 YAC 克隆，但带正电荷的膜应用于 BAC 和 PAC 以及 DNA。对于 YAC 的网格划分，有必要用复制机的针拨孔底的细胞层，对于克隆的网格划分，在划网格之前，可将尼龙膜放到一合适的营养琼脂板上。

对所有的触头与过滤器外表接触时应该谨慎操作。栅格化后，琼脂板和过滤器应在 30℃孵化 27h（YAC）或在倒置环境下 37℃孵化 12～16h（BAC、PAC）。用适当的方法将菌落溶解。在这种方法中低密度的栅格用来对较小的基因组的杂交进行分析，备用，或者 PCR 筛选的单微量滴定法皿来跟踪一个克隆，将克隆进行杂交，用以此克隆的杂交。

高密度菌落和 DNA 过滤器的自动栅格化

高密度克隆和 DNA 芯片可以通过客户建立和商业化自动化系统定制。商业自动化系统可从 Genetix、BioRobotics、Genomic Solutions、Beckman 公司获得。这些系统有额外的功能，如克隆的精选、标准模式及其他模式的选取。这些栅格化的系统的特性在表 5.2.1 中列出。表 5.2.2 显示自动栅格化系统的实例，其由一个精度为 5μm，建立在线性诱导驱动上的 x-y-z 平台。这些机器设计时达到可使用在－80℃贮藏架保存的微量滴定板材料的水平，也可以在 12 个栅格的琼脂皿（8cm×12cm）的容器中进行过滤。

表 5.2.1　商业栅格化系统的比较[a]

供应商	Genetix	BioRobotics	Genomic Solutions	Beckman[b]
系统名称	Q Bo	Bio Grid	Flexsys	Biomek2000
96 和 384 孔栅格	均可	均可	均可	均可
过滤器尺寸(数量)	22×22(15)	22×22(4)	22×22(3)	8×12(11)[c]
		8×12(24)	8×12(8)	
自动过滤	否	否	可选	可选
自动载板(量)	是(72)	是(24)	可选(112)[d]	可选
干燥法	否	热空气	否	可选风扇
空气过滤	可选	可选	可选	否
Barcode 读取	可选	可选	否	否
添加容量				
克隆贴片	是	否	可选	否
复制	是	是	是	是
重排列	是	否	可选	是
液体处理	否	否	否	是
玻片上的微阵列	否	否[e]	可选	否

a. 欲了解这些系统更多的详情，请登录附录 4 中给出的网址 ；b. Beckman 的 Biomek2000 主要是一个液体操作的系统且栅格容量可选；c. Biomek2000 基本平台有 12 个可用的位置用于微量滴定板或 8cm×12cm 的过滤板，所以过滤器的最大数量可以栅格到 11 个。这种容量可通过使用边侧输入器进行调节；d. Flexsys 自动载料器保持 15 个托盘，每个可适应 8 标本的微量滴定板，8 个 8cm×12cm 的滤板，或一个 22cm×22cm 的滤板；e. 在这一项中 BioRobotics 面向市场的产品是一个可选择性的系统。

这些操作涉及自动化菌落栅格化及它们的变更，其如下。在每次栅格化运行前的准备，用 95%的乙醇进行灭菌操作。Ink 和声处理为可选择性但推荐使用的方法。Ink [如 autoclaved 1%(V/V) Higgins Black Magic ink]用于产生一个与最终克隆结果精确配对的栅格。

作为一个辅助来评价杂交数据。声处理室包含 0.1%(V/V)的 Decon Neutracon (Merck)，用于 ink 栅格化和每次栅格化运行结束后针的清洗。如果声处理室无效，栅格针应用 Decon 液进行刷洗。栅格化的材料的板在室温下的单层中溶解，然后放置到仪器床上。一些系统(图 5.2.2)允许自动化选板和去盖，而其他仪器盖子只是在开始运行机器前手动去掉。这种接受尼龙过滤板(见下面膜类型)也位于机器床上，同时营养物琼脂板或者 Whatman 3MM 型过滤纸被营养液弄湿。这种仪器被适当的栅格工具装备，相比于固定的针能完美地浮动(图 5.2.3)。这样就能保证过滤器和针能在所有位置上较好的接触，同时使过滤器的损伤最小化，同时保证针与微量滴定板孔的底部的接触。后者对 YAC 库尤其重要，由于酵母细胞在中密度液体中沉降很快。当栅格化一个 YAC 板较多拷贝时，仪器会按程序设计进行，于是栅格化针绕容器成螺旋状旋转。这种板在栅格前在商业化的摇床上摇动。最后这种栅格区域关闭，原因在于使用安全和使污染最小化。一些如空气过滤的设计装置用于最小化污染。仪器内部在栅格化操作前会被紫外线照射。

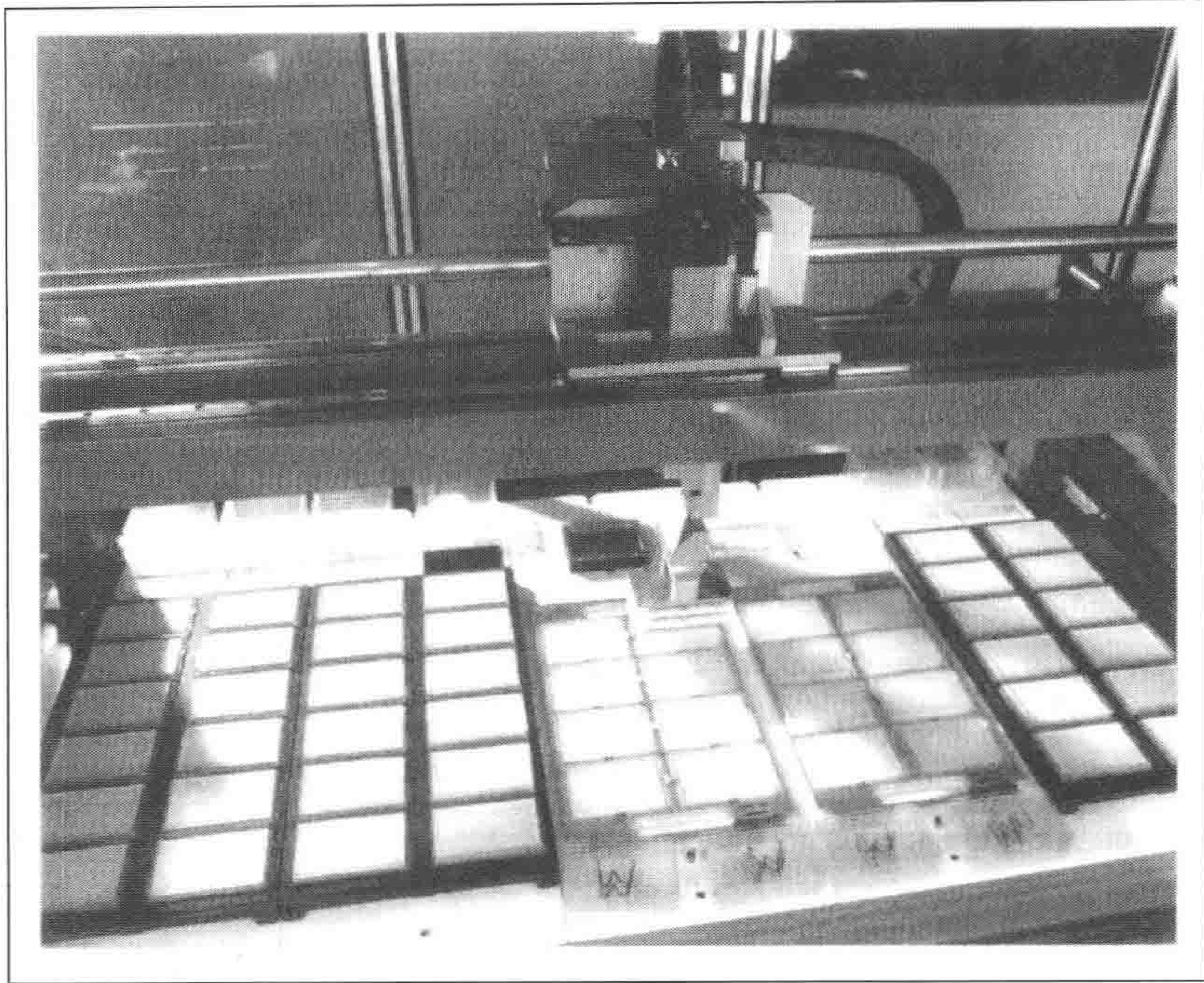


图 5.2.2　菌落栅格化工具。

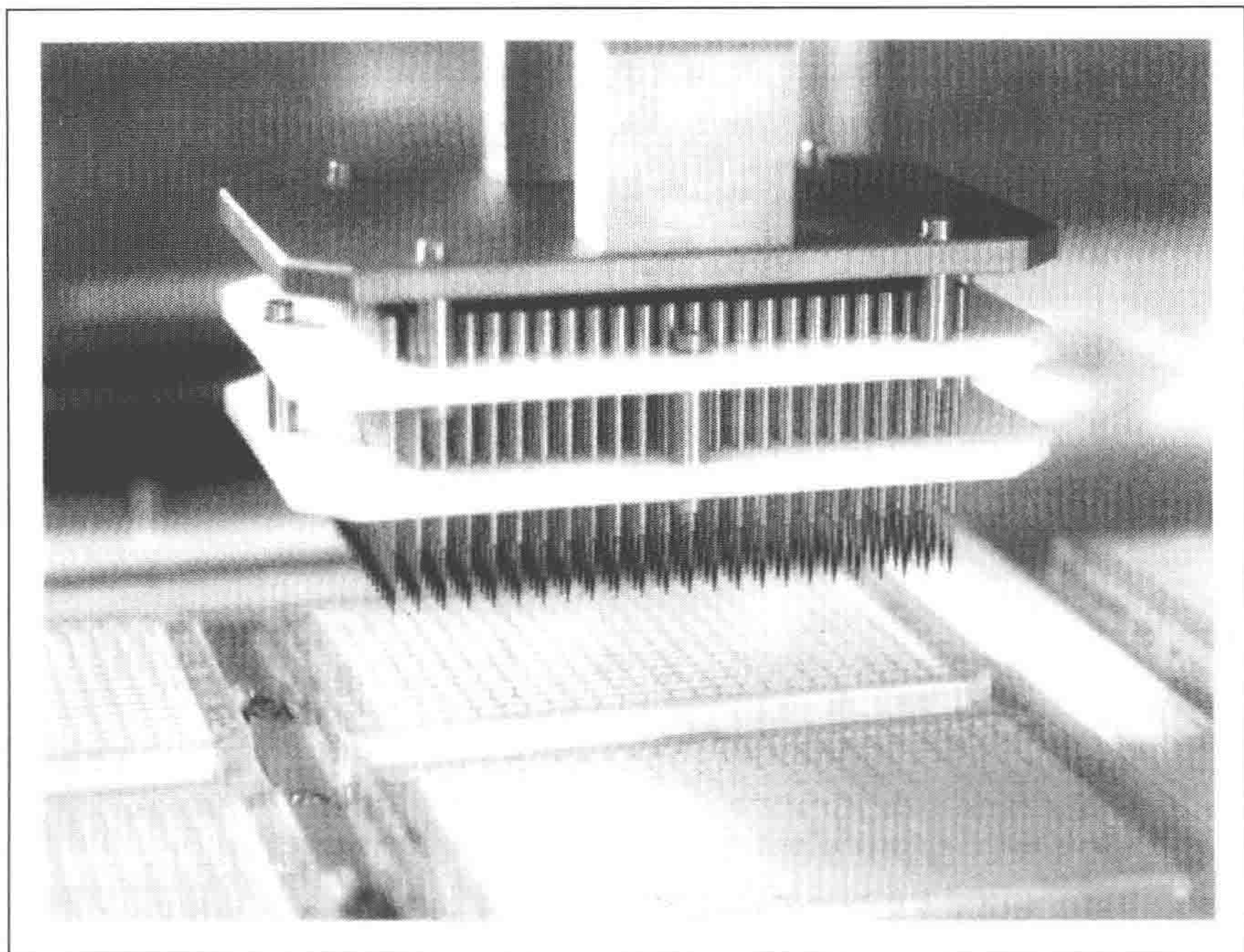


图 5.2.3　针对高密度自动菌落栅格化的具有 384 个浮动针的工具。不锈钢针具有逐渐处理变细直至每点直径为 0.4mm 的圆锥形针头。它们适合栅格化的密度最低限度为 5×5(也就是 25384 孔板代表一个 8cm×12cm 的面积)。

仪器初始化，选择程序来执行下列步骤：

1. 把针头浸入灭菌池；
2. 蒸发乙醇；
3. 把针头浸入第一个微量滴定板；
4. 栅格化薄膜 1；
5. 对于所有接下来的过滤重复第 3 和 4 步；
6. 对于所有接下来的微量滴定板重复第 1～5 步。

一些机器需要装备干燥器（强力热风或卤素灯）用于乙醇蒸发，但也有用风干的方法。在这两种情况下，精确的杀菌和干燥的时间应该根据经验来制定。一个微量滴定板的加样位置与下一个位点轻微的偏移，允许大量的克隆分配在相对小的区域里。

克隆的适当密度依赖于需要被网格化的克隆总量，滤纸上的每个克隆的拷贝数量，针头的直径和自动图像分析系统评分的可行性。实际上，油墨栅格的存在允许对于 4×4 密度为 384 孔格的精确手工评分（也就是说，16384 孔板在 8cm×12cm 的滤纸上或 6×16384 孔板在 22cm×22cm 的滤纸上）。高密度栅格的应用需要使用针对阳性信号或针对每个克隆多样点样方案评分的自动化体系（如下）。

经鉴定阳性克隆或 DNA 池的微量滴定板地址与它们在网格上的坐标相符（图 5.2.4）。在非常高的密度下，坐标分配可能有问题，但是可以辅助于各种方法，包括油墨栅格的运用。另外一种受到一些研究者喜爱的方法是运用一种特意设计的根据这个方格内的两个杂交信号的相对位置来显示阳性板数目的栅格顺序将每个板栅格化两次。这种方法明显的缺陷是在一个过滤器上出现的克隆数目会减半。

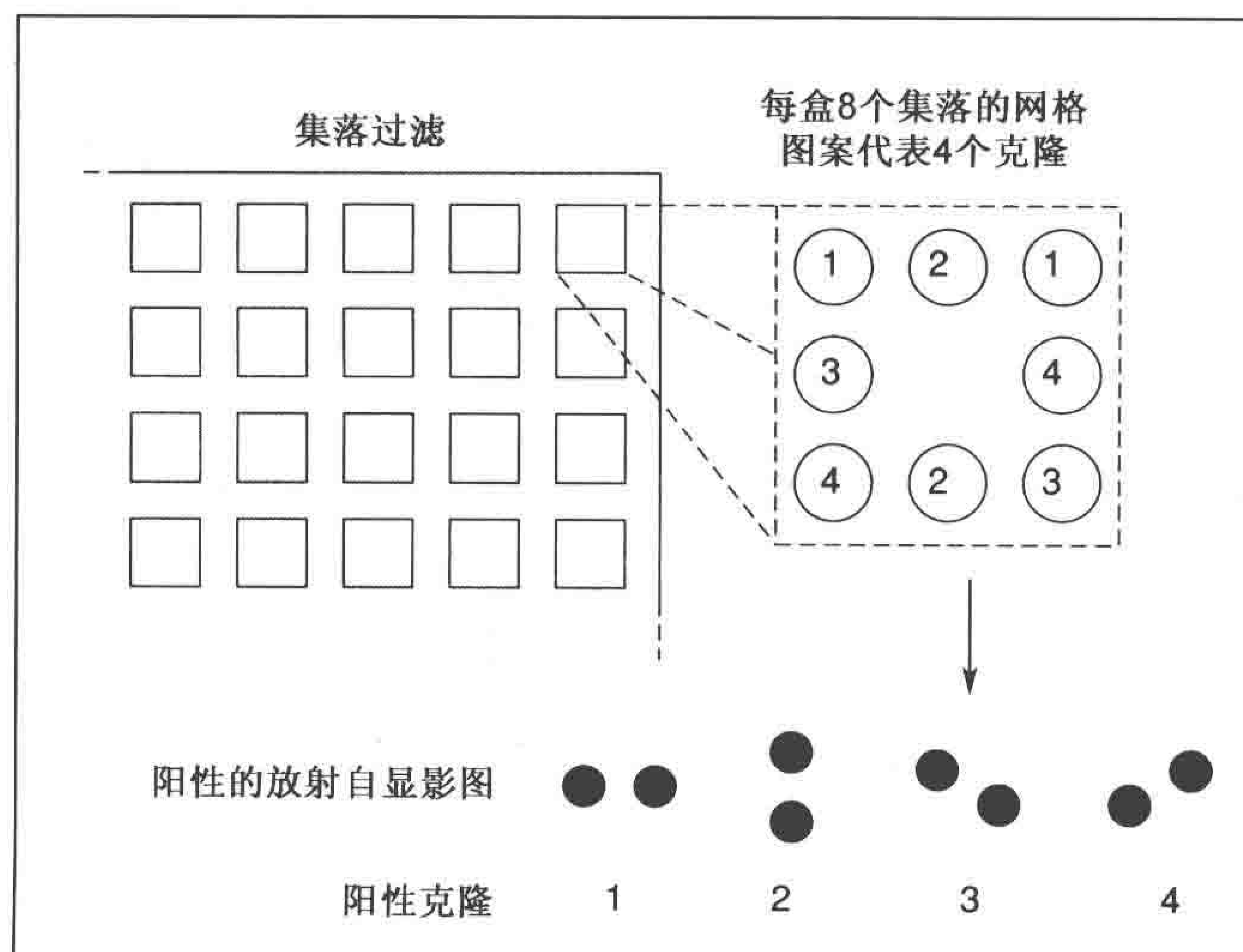


图 5.2.4 集落复制和一个复杂点的图案是阳性克隆的辅助鉴定。每个克隆是点图案展示在扩展盒中，并且阳性克隆被杂交信号的相关位置鉴定。中心空白的位置用黑点作为辅助的痕迹而定位。

支持方案 准备 BAC 和 PAC 菌斑用于杂交

材料(标√的条目参见附件 1)

PAC 或 BAC 菌落排列在尼龙过滤器上(基本方案 1)
√LB 琼脂板包括 30μg/ml 卡那霉素(PAC)或 20μg/ml 氯霉素(BAC)制成 8cm×12cm (Genomic Solutions)或 22cm×22cm 平板(Nunc)
√10%十二烷基硫酸钠(SDS)
变性液:0.5mol/L NaOH/l.5mol/L NaCl
√1mmol Tris·Cl,pH 7.4
√1×中和液:0.5 mol/L Tris · Cl,pH 7.4/1.5 mol/L NaCl
√2× SSC
2×SSC/0.1% SDS
Whatman 3MM 滤纸
塑料盘
定轨摇床

1. 在 37℃含抗体的 LB 琼脂板上孵育做了网格标记的 BAC 或 PAC 克隆的滤纸 12~16h,直到菌落的直径为 0.5~1mm。
2. 在 10%SDS 里浸泡两片 Whatman 3MM 过滤纸(直到湿润,但液体不要浸透滤纸表面为宜,同时放置在一个塑料盘上,避免气泡出现,室温下放置 4min。
3. 将两块 3MM 的 Whatman 滤纸在变性液中浸泡,然后将滤纸放到上面,室温放置 10min。将滤纸放在新的干燥的 Whatman 3MM 滤纸上自然干燥。
4. 将若干张滤纸一张接一张地放到一个盛有中和液的容器中并确保每一张都充分浸透。放在摇床上轻轻地晃动,浸泡 5min。重复一次,如果中和液的 pH 高于 8.0,则需要更换新鲜的中和液。
5. 将所有的滤纸按照如下方式进行处理:
   0.1×中和液中 5min;
   2×SSC/0.1%/SDS 5min;
   2×SSC 5min;
   50mmol/L Tris·Cl,pH 7.4,2 次,每次 5min。
6. 在新的干燥的 Whatman 3MM 滤纸上自然干燥至少 1h,克隆面朝上。室温下在若干张 3MM 的滤纸中存放滤纸。
7. 使用之前,交联 DNA 2min,克隆面朝下,同时用 254nm 的紫外光(120 000MJ/cm^2)进行照射。然后与克隆点进行杂交(基本方案 2 或者备选方案)。

基本方案 2 通过克隆杂交筛选 BAC、PAC 及 P1 文库

材料(标√的条目参见附录 1)

用于BAC、PAC 或者 P1 文库的高密度滤纸(市场有售,或者按照基本方案及支持方案进行准备)

50ng DNA 用于放射性标记反应(与任何载体序列无关)

10～40μCi[α-^{32}P]dNTP(3000Ci/mmol)

√预杂交溶液

√5×SSC(附录 1)含有 2.5mg/ml 声处理过的人 gDNA(从 10mg/ml 的家系中准备,可选的)

√杂交液

√洗涤液:1mmol/L Tris · Cl,pH8.0/1% *N*-lauroylsarcosine(见每个样品的配方,每天准备新鲜的)

√1mmol/L Tris · Cl ,pH8.0

纸巾

胶片(旧放射自显影照片)

放射自显影照片

静电保护器(抗静电的喷雾器)

赛纶丝巾或者别的透明的塑料丝巾

带有管和瓶的杂交烤箱

100℃的水浴箱或者保温箱

放射自显影设备

1a. 通过随机寡核苷酸介导的合成方法,用 30～40μCi[α-^{32}P]dNTP 标记 40～50ng 的探针 DNA(附录 3E)。将探针从能参与标记的[α-^{32}P]dNTP 中纯化出来并检测放射活性(成功标记的探针为 5×10^6～7×10^6 cpm)。

1b. 另外,作为杂交探针,还可以通过在 PCR 的过程中对 PCR 产物进行放射性标记,如 STS。

2. 把滤纸卷成桶状并放入试管中,然后再放入杂交瓶。加入 15ml 预杂交液后封闭杂交瓶。把杂交瓶放入 55℃的杂交烤箱以 20～30r/min 的速度旋转至少 1h。必要时需加一平衡管与其平衡。试管中的滤纸必须要覆盖试管的管口,且每个试管必须超过 6 张滤纸,每增加一张滤纸需增加 2ml 溶液,使用尼龙网有助于杂交液流动。

3. 加热探针,100℃, 5min。对于含有重复单元的探针杂交,需要将探针置于含 2.5mg/ml 超声处理的 gDNA 的 5×SSC 溶液中 65℃,30～60min。

4. 把探针加到 15ml 杂交液中,将杂交瓶从杂交烤箱中取出,用探针和 15ml 杂交液混合液取代预杂交液。封闭瓶口,再将其放入杂交烤箱,55℃孵育 12～16h。

5. 将杂交瓶从杂交烤箱中取出,并将杂交烤箱设置为 25℃。用 40ml 洗涤液取代杂交瓶中杂交液,然后再把杂交瓶放入杂交烤箱,25℃洗涤 15min,然后再用 40ml 1mol/L Tris · Cl pH8.0 洗涤 4 次,如果背景太高,把温度升高到 42℃。

6. 把滤纸从杂交管中取出并展开,把每张滤纸分别放在 paper towel 上,使滤纸上的液体绝大部分滴干,把每张滤纸(DNA 一面朝上)放在一张旧胶片上。用 Static Guard 进行喷雾并用尼龙丝巾盖住。用滤纸对放射自显影胶片进行暴光 12h,成像。操作过程中应小心地将滤纸包裹在丝巾中。包裹并放置在－20℃中。常见问题见表 5.2.2。

表 5.2.2　常见问题

问题	可能原因	解决方法
没有阳性克隆	探针没有有效地进行放射性标记	检查标记方法 检查用于标记的来源 DNA 的完整性
	滤纸的质量差	在新的滤纸上重复实验
高背景	未杂合的标记物没有去除	检查纯化探针的方法
	洗得不充分	重复洗；增加漂洗的强度
	滤纸的质量差	在新的滤纸上重复实验
成千上万个阳性克隆	在探针上有重复序列	找到重复单元在探针 DNA 上的位置并避免这些重复序列 在探针的预退火反应或杂交反应中阻断 DNA（大马哈鱼精子或者人胚胎或者 C_0t_1 DNA）
	在探针中存在载体序列	找到载体序列在探针 DNA 中的位置并在以后的探针设计过程中避免它们

7. 检查阳性克隆板及位置。如果是使用商业滤纸，应从供应商那里获得阳性克隆并对每个单克隆划痕。如果是按照支持步骤准备的滤纸，则从保存的克隆板中重新获得克隆并划痕。
8. 准备一个包含斑点板，每个斑点对应阳性克隆或者一个阴性对照。按照标准的挑选克隆、裂解、杂交实验方法来确定每个阳性克隆都含有目的序列（支持方案）。

备选方案　制备 overgo 寡核苷酸探针并进行克隆斑点杂交

当只有有限的序列可被用于设计探针时，overgo 探针图 5.2.5 中较短的长度就可以体现出它的优势。这些探针可用于鉴别特殊的克隆，其中包括 YAC、BAC、PAC、高密度过滤纸上的 P1 克隆或用于 Southern 斑点杂交分析，当设计 overgo 探针时，所用的序列首先必须被表示为重复单元和低复杂性的 DNA 序列。Repeatmasker（http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker）和基因组序列中心（http://genome.wustl.edu/gsc）是有用的资源。

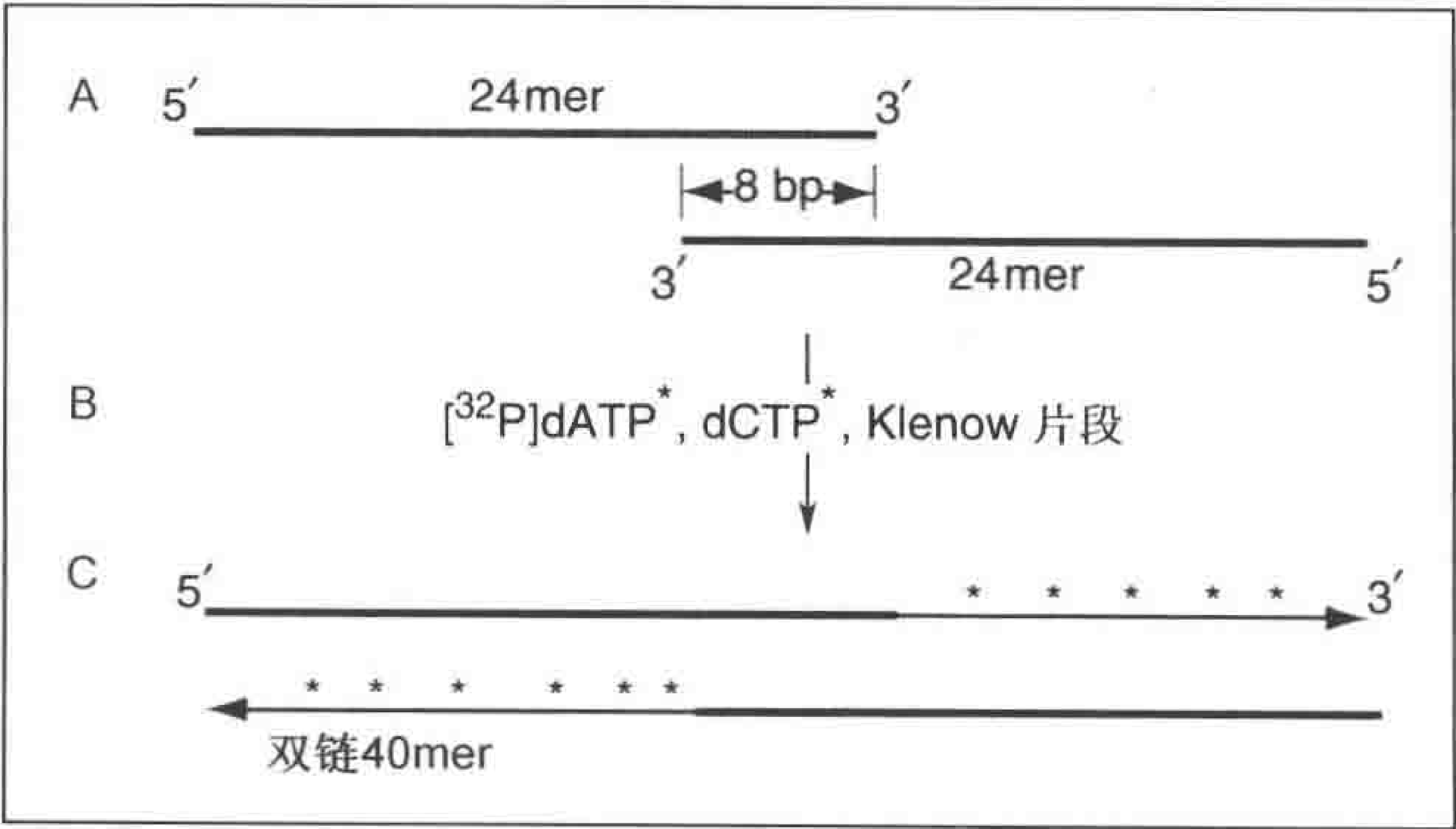


图 5.2.5　两个有 8bp 重叠的 24mer 寡核苷酸被复性以形成 2 个 16bp 悬臂（A）。klenow 片段用于填充悬壁（B）。终产物（C）是具有特异活性的双链 40mer 寡核苷酸。

材料(标√的条目参见附录1)

2条有重叠配对的,可用于产生各自的探针的24mer的寡核苷酸
√2mg/ml的牛血清白蛋白(BSA)
√overgo标记缓冲液
10μCi/μl[α-^{32}P]dATP(约3000Ci/mmol)
10μCi/μl[α-^{32}P]dCTP(约3000Ci/mmol)
大肠杆菌聚合酶Ⅰ的Klenow片段
10%(*m/V*)三氯乙酸(TCA)
95%乙醇
√Church杂交缓冲液,60℃
√20×SSC
√10% SDS
靶DNA在尼龙膜上的固定(基本方案1和支持方案)
玻璃纤维过滤盘(A/E纤维过滤器;Gelman)
真空过滤架
葡聚糖凝胶G-50微小spin柱(如NICK spin柱;Amersham Pharmacia生物技术公司)
杂交炉
放射自显影设备和材料

1. 对于每一个产生的overgo探针,将相互配对的两条寡核苷酸转移10pmol到管中或微量滴定板中,并与水混合使总体积达到4μl。
2. 盖上管子或微量滴定板,将其中已经配对的寡核苷酸80℃加热5min使其变性,然后37℃10min使缺口形成。将已复性的寡核苷酸放冰上直到它们被标记。如果标记的过程不能在1h内进行,那么在操作前重复上述两步准备工作。
3. 准备一管标准混合液,用于overgo探针的标记。它包含以下成分(增加10%的量以补偿第1步中的损失)
0.5μl 2mg/ml BSA;
2.0μl overgo标记缓冲液;
0.5μl 10μCi/μl(约3000 Ci/mmmol)[α-^{32}P]dATP;
0.5μl 10μCi/μl(约3000 Ci/mmmol)[α-^{32}P]dCTP;
1.5μl H_2O;
1μl 2U/μl Klenow片段。
4. 往每个有已复性的寡核苷酸的管中加6μl标准混合液,室温下温育1h。
5. 快速检测是否标记上。点1μl混合液到玻璃纤维过滤盘上,并且用盖革计数器测量它的cpm。用10%的三氯乙酸将真空过滤加顶部打湿,然后将玻璃纤维过滤盘放上去使它也变湿。缓慢打开真空过滤架,先用1ml以下的10%的三氯乙酸清洗玻璃纤维过滤盘,再用1~2ml的95%的乙醇清洗,放置30s使它干燥,关掉真空过滤架,拿出过滤盘,再次测量cpm。

有40%～60%被标记的寡核苷酸是被固定在玻璃纤维过滤盘上的，大多数情况下，残留的探针中被标记的只有10%可用于大多数用途。然而，如果探针被混合到一起了，当每一种探针被大概等量的标记时才能得到最好的结果。

6. 为了达到最好的效果，在杂交之前，将标记好的寡核苷酸过葡聚糖凝胶G-50 microspin柱(根据制造商的操作规程操作)。
7. 尼龙膜预杂交。用60℃的Church杂交缓冲液将尼龙膜浸湿，然后将尼龙膜放入杂交瓶中，瓶中装有20ml的60℃的Church杂交缓冲液，60℃温育1h。
8. 将标记好的探针加热到90℃10min，将放有尼龙膜的杂交瓶中的杂交缓冲液取5ml放入15ml离心管，加入探针，然后再移回杂交瓶中，60℃温育过夜。
9. 将缓冲液倒出，加200ml 2×SSC/0.1%SDS。将杂交瓶再放回杂交炉中温育10min，将SSC溶液倒出。
10. 将过滤器放入2L 60℃ 1.5×SSC/0.1%SDS溶液，轻微晃动，清洗30min。再用0.75×SSC/0.1% SDS 2L重复上述步骤。
11. 用塑料纸封膜，在－70℃用一个增强的荧光屏放射自显影拍照(通常在晚上)。确定阳性克隆，并与相应的孔、板对应位置。
12. 当上述操作完成后，将探针从过滤纸上洗脱。85℃用2L0.2×SSC/0.1%SDS洗30min，通过放射自显影拍照检查。

参考文献：Bentley et al.，1992；Nelson et al.，1989

编　　者：Mark T. Ross，Sam LaBrie，John McPherson

单元5.3 胚胎将大片段插入DNA导入哺乳动物细胞和胚胎

图5.3.1为此程序概述。

注意：所有与活细胞接触的试剂和仪器必须是无菌的(除非特别说明)，所有的组织孵育均使用保湿的37℃，5% CO_2 恒温箱。

基本方案1　通过质体融合将完整的YAC导入哺乳动物细胞

材料(标√的条目参见附录1)

靶细胞：培养的贴壁生长的哺乳动物细胞(如小鼠胚胎干细胞)

√SD dropout 培养基和培养板：SD-Ura-Trp-His

带有以*neo*(G418-resistance)为筛选标记的YAC的酵母菌株

1mol/L 山梨糖醇(室温储存)

√SCE溶液

溶解在SCE溶液中的20mg/ml藤黄节杆菌酶(zymolyase)20T(ICN Biomedicals)；逐步增加新储存液的量来确定在45～60min内产生90%圆球体所需的酶量

√10%(*m*/*V*)SDS

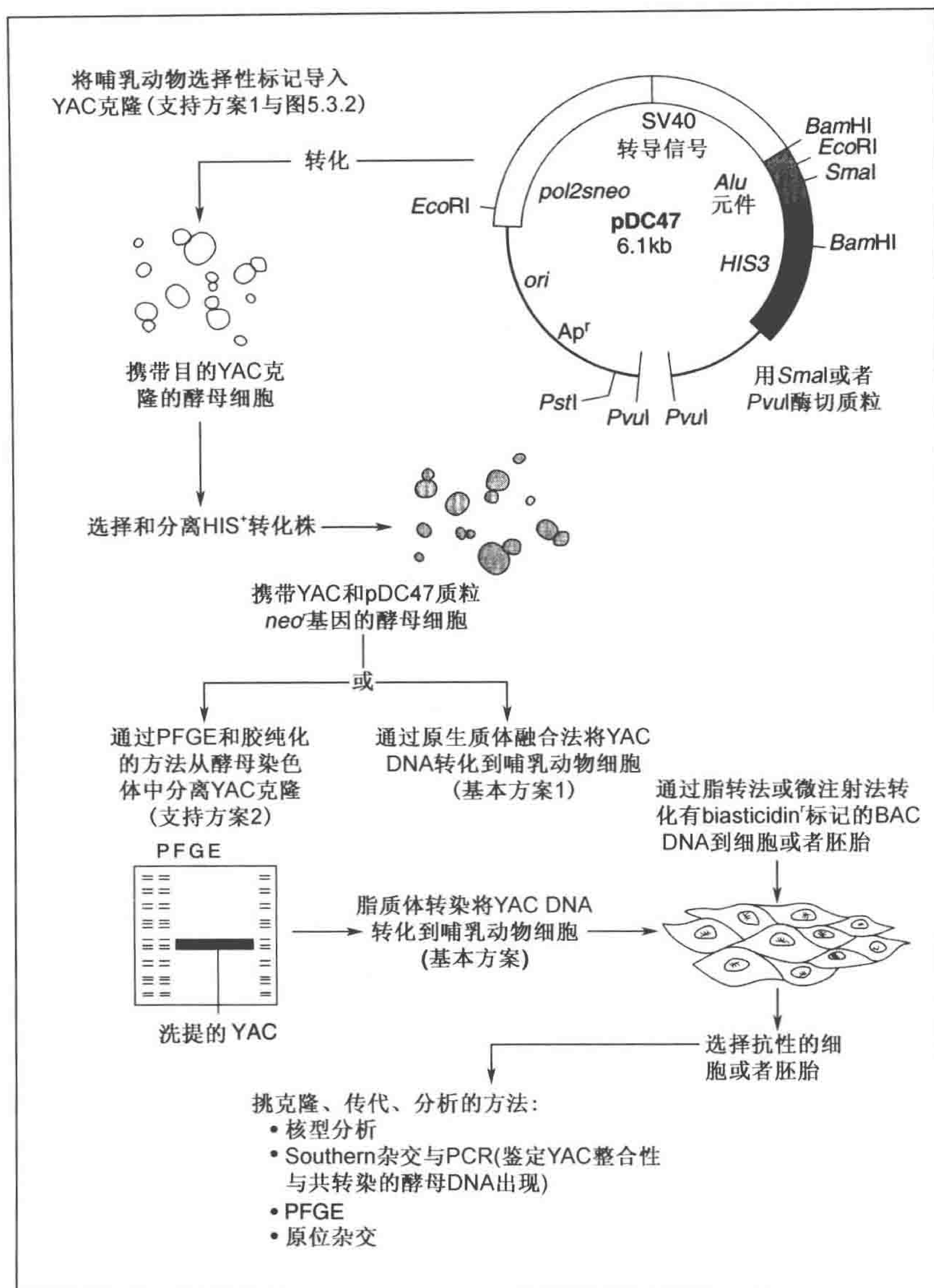


图 5.3.1　用标签标记 YAC 及导入哺乳动物细胞。

ST 溶液：1mol/L sorbitol/10mmol/L Tris·Cl，pH 7.5(附录 1)

√PBS

0.05% 胰酶/0.53mmol/L EDTA(Life Technologies)

加血清(附录 3I)的适合哺乳动物细胞的完全培养基,加或不加 200～800(μg/ml G418(Life Technologies)，室温。

不加血清或其他添加剂的适合哺乳动物细胞的完全培养基，室温。

50%(*m*/*V*)聚乙二醇(polyethylene glycol，PEG)1500(fusion-tested；Boehringer Mannheim)

合适的 PCR 引物(表 5.3.1)

合适的放射性标记的探针(表 5.3.2；放射性标记参见附录 3E)
小鼠 Cot-1 DNA(Life Technologies)
√20×SSC
直径 100mm 培养皿和 24 孔组织培养板
15ml 带盖玻璃培养管
带转鼓和振荡器的 30℃恒温箱
500ml 带盖的 Erlenmeyer 培养瓶
带 TH-4 转子和离心桶(或 equivalent)的 Beckman TJ-6 离心机
相差显微镜
Cloning cylinders(单元 3.1)
65℃ 水浴

表 5.3.1　在导入哺乳动物细胞前和导入以后，用来检测 YAC 完整性的 PCR 引物

引物[a]	序列	产物大小/bp
NEO1	5′-GATTGCACGCAGGTTCTCCG-3′	654
NEO2	5′-CCAACGCTATGTCCTGATAG-3′	
URA3A	5′-AATGCACACGGTGTGGTG-3′	277
URA3B	5′-CGTCTCCCTTGTCATCTAAACC-3′	
XIST1	5′-GGGACCTAACTGTTGGCTTTATCAG-3′	203
XIST2	5′-GAAGTGAATTGAAGTTTTGGTCTAG-3′	

a. PCR 反应条件——30 个循环：95℃，1min；60℃，1min；72℃，2min。

表 5.3.2　在导入哺乳动物细胞前和导入以后，用来检测 YAC 完整性的探针

探针靶位点	质粒	限制性内切核酸酶	大小/kb	参考文献
TRP1	pYAC4	*Pst* Ⅰ/*Xba* Ⅰ	0.6	Burke *et al.*, 1987
URA3	YEP24	*Hind* Ⅲ	1.2	Botstein *et al.*, 1979
Acentric YAC arm	pBR322	*Pvu* Ⅱ/*Sal* Ⅰ	1.4	Burke *et al.*, 1987
Centric YAC arm	pBR322	*Pvu* Ⅱ/*EcoR* Ⅰ	2.3	Burke *et al.*, 1987
neo	pDC47	*Xba* Ⅰ/*EcoR* Ⅰ	0.8	D. E. C., unpub. observ.
Alu element	pDC47	*Bam*H Ⅰ	0.33	D. E. C., unpub. observ.
LINE element	pBP90	*Cla* Ⅰ/*Nco* Ⅰ	0.4	Pavan *et al.*, 1990
B1 element	pB1con	*Pst* Ⅰ/*Sst* Ⅰ	0.3	J. McKee-Johnson, unpub. observ.
Ty1	pJEF1271	*Xho* Ⅰ	6	Eichinger and Boeke, 1988

1. 开始扩增哺乳动物细胞，在开始约 3d 内 100mm 组织培养板中的细胞会合度达到 90%，细胞数量达到 10^7 (足够 5 次融合，每扩增 2×10^6 个细胞融合一次)。
2. 在细胞达到 90% 会合度前两天，将带有 *neo* 标记 YAC 的酵母单克隆接种到盛有 5ml SD-Ura-Trp-His 培养基的 15ml 玻璃培养管中。30℃ 转鼓孵育过夜。
3. 第二天，将第二步所得酵母培养物接种到盛有 100ml SD-Ura-Trp-His 培养基的 500ml Erienmeyer 培养瓶中。30℃剧烈摇动培养过夜。

4. 在进行融合的当天早晨，添加 25ml 新鲜 SD-Ura-Trp-His 培养基到酵母培养物中 30℃剧烈摇动 1.5h 或 OD_{600} 达到 1.2～1.5。
5. 将酵母培养物分装至 4 个 50ml 尖底离心管，室温下 500*g* 离心 5min（2000r/min，Beckman TH-4 转子）。用 5ml 1mol/L 山梨糖醇重悬沉淀物，将重悬的细胞倒入一个 50ml 尖端离心管。
6. 再次以 500*g* 离心 5min，去除上清液。加入 20ml 1mol/L 山梨糖醇，500*g* 离心 5min，去除上清液。用 20ml SCE 溶液重悬细胞，加入 100μl 20mg/ml 藤黄节杆菌酶 20T。30℃孵育 30min。
7. 在盖玻片上滴 10μl 10% SDS 加入 10μl 细胞悬液。用相差显微镜检查球形体的形成。溶解了的球形体呈灰暗细胞形骸；不能溶解的细胞（如未去壁细胞）则具有高度回缩性。
8. 继续 30℃孵育，每 10 ～15min 检测一次球形体形成情况，直到 85%～95%的细胞去细胞壁。

   从此时起，必须密切关注以免脆弱的球形体细胞裂解，必须极慢极轻地摇动 1h 以重悬。
9. 4℃以 250*g* 离心球形体 7min（1000r/min，Beckman TH-4 转子）。倒去上清液，加入 20ml ST 溶液洗细胞，极慢极轻地摇动重悬沉淀物 。重复洗一次以 10ml ST 溶液轻轻重悬。
10. 将 10μl 球形体悬液加入 990μl ST 溶液中并用血细胞计数器（附录 3I）计数。如有需要，可用 ST 溶液将球形体悬液稀释至 0.8×10^{8}～1.4×10^{8} 个球形体/ml。将球形体置冰上，为保持其悬浮状态，每 5～10min 轻摇一次。
11. 每个 100mm 培养皿加入 5ml PBS 洗哺乳动物靶细胞，共 2 次。加入 1ml 胰酶/EDTA，37℃ 孵育直至细胞由培养皿上脱落。用 12～14ml 加血清的完全培养基重悬约 10^{7} 个细胞并转移到一个 15ml 离心管中。血细胞计数器进行细胞计数确定细胞浓度（附录 3I）。
12. 4℃ 250*g* 离心靶细胞 3min，用无血清培养基重悬至 2×10^{6} 个细胞/ml 。每一次融合作用（至少 4 次以形成 PEG 处理的时程变化），将 1ml 重悬细胞转移到一个 15ml 离心管，250*g* 离心 3min，不要将上清液倒出。
13. 将 1×10^{8} ST 溶液重悬的球形体加到上清液顶部。250*g* 离心 3min 后小心吸去上清剩余 50～100μl 培养基。用剩余液体轻轻研磨沉淀物，以充分重悬细胞。
14. 加入 2ml 50% PEG 1500 并通过使用 5ml 移液管轻轻吹打 3 次以混匀。混匀后，立刻开始计时融合的时间。

    最佳 PEG 处理时间因细胞系而异，要靠摸索出的经验确定；每组融合反应均应设置一个处理时程，分别进行 30、60、90 或 120s 的融合反应。
15. 在反应结束时，加入 5ml 无血清培养基，轻颠倒 3 次，250*g* 离心 3min，用加血清的完全培养基轻轻重悬沉淀物，以 2×10^{5}～5×10^{5} 个细胞/皿的密度将融合细胞接种到4～10 个 100mm 组织培养皿中。

    接种皿的数量和接种细胞的数量由有细胞生长率和 *G*418 杀死敏感细胞所需的时间决定。接种密度应足够低，以至在 *G*418 杀灭敏感细胞之前，皿中细胞不会过度生长。

16. 在融合后 12～18h，用加有 200～800μg/ml G418（因细胞类型而异）含血清的完全培养基给细胞换液。持续用含血清和 G418 的完全培养基培养 8～14d，直到大多数细胞死亡，而 G418 抗性（如 neo^r）克隆出现。
17. 用 cloning cylinders 将单克隆分别转入加了含血清和 G418 的完全培养基的 24 孔组织培养板的一个孔中。对于胚胎干细胞（embryonic stem cell，ES-cell）的融合反应来说，挑几十个克隆有助于减少大部分细胞在亚克隆化时死亡的风险和扩增未经分化的细胞。扩增细胞用于冻存和 DNA 分析。
18. 从单个 G418 抗性克隆扩增的大约 10^6 个细胞中提取 DNA（附录 3A）。
19. 用表 5.3.1 中的引物 PCR 扩增检测 *URA3* 和 *neo* 筛选标记的有无，连同作为对照的各克隆亲代酵母菌株 DNA 中 YAC 的有无 分析各克隆的细胞。使用如下的 PCR 循环参数。

    30 个循环：1min 95℃
    　　　　　1min 60℃
    　　　　　2min 72℃
20. 通过 PCR 扩增，或者通过琼脂糖凝胶电泳结合用合适放射性标记 DNA 探针进行的 Southern 印迹杂交（Southern blot hybridization；附录 3G）来确定有无已知基因或 YAC 上的标记。煮沸 10min 后冰上冷却 1min。65℃孵育 10min。将预变性探针加入杂交缓冲液进而进行 Southern 印迹杂交分析。
21. 制备“*Alu* 图谱”（*Alu* profiles）（为了确定 YAC 的完整性）。用几种限制性内切核酸酶酶切第 18 步制备的各克隆细胞 DNA、Southern 印迹、用人 *Alu* 探针探测样品中跨 YAC 的片段。*Alu* 探针与小鼠重复 DNA 预退火。反应体系：

    50ng 探针 DNA；
    100μg 小鼠 Cot-1 DNA；
    25μl 20×SSC；
    加水至 100μl。
    煮沸 10min 后冰上冷却 1min。65℃孵育 10min。将预变性探针加入杂交缓冲液中进而进行 Southern 印迹杂交分析。
22. 通过与酵母 Ty 重复元件探针 Southern 印迹杂交确定酵母 DNA 的有无（Ty 阳性限制性片段的数目提供了一个存在于细胞中酵母量的信息指示）。
23. 从细胞系中制备中期伸展分裂相（单元 8.2）、染色体带（单元 4.3）和核型分析（附录 3K）。

备选方案　使用脂质体将胶纯化的 YAC DNA 引入哺乳动物细胞

附加材料（见基本方案 1；标√的条目参见附录 1）

含带有 *neo* 筛选标记的完整 YAC DNA（支持方案 1）的 PFGE 胶条（基本方案 2）
√透析缓冲液 I
1U/μl β-琼脂水解酶（New England Biolabs）
Lipofectin（Life Techologies）或其他可用于 DNA 转染的阳离子脂质体（如

Transfectam Promega)

用于优化脂转效率的阳性对照 DNA（可在靶细胞中表达的 neo^r 标记质粒，如 pDC47）

40℃和 65℃水浴

35mm 组织培养皿

5ml 聚苯乙烯管

1. 将含 YAC 的 PFGE 胶条放入 50ml 圆锥管，加入 30～40ml 透析液在 4℃透析 10～12h，其间换透析液 3 次。
2. 倒出透析液，将胶条切成 0.5～2.0ml 的片段，放入离心管。在 65℃水浴至琼脂糖完全融解，40℃平衡 5min。
3. 加入 10U β-琼脂水解酶，并轻轻吹打混匀。40℃孵育 60～120min 至琼脂糖融化完全。将离心管置于冰上，查看有无琼脂凝块。如仍有凝块存在，再次在 65℃熔胶，然后冷却到 40℃，再加入 10U β-琼脂水解酶，40℃孵育直到琼脂糖完全融化。如 YAC DNA 将存放 24h 以上，应在 55℃灭活琼脂水解酶 10min，存放于 4℃。
4. 可通过脉冲场电泳或 Southern 斑点杂交检测纯化的 YAC DNA 的完整性。
5. 为了优化条件，接种 2×10^5～4×10^5 靶细胞至 35mm 组织培养皿中，18～24h 后转染。有些细胞须调整接种密度，使之 18～24h 后达到 80%～90%汇合。
6. 准备 6 个 5ml 聚苯乙烯管，先加入 200μl 无血清培养基，再分别加入 0、5、10、20、40、80μg 阳离子脂质体和 100ng 阳性对照质粒。室温孵育 45min，使之形成稳定的脂质/DNA 复合体。然后加入 0.8ml 无血清、无抗生素的培养基。
7. 吸除靶细胞的培养基，分别加入 1ml 脂质/DNA 混合物，培养 4～18h（依细胞类型而异）。
8. 用含血清和抗生素的培养基换液，培养 24～48h。用胰酶消化各皿中细胞，分别传至 100mm 组织培养皿，用含 200～800μg/ml G418 的筛选培养基培养。在 8～14d 后，计数各皿 G418 抗性克隆数，确定克隆形成数最多的脂转条件。
9. 确定转染条件后，用含血清和抗生素的培养基接种最终转染靶细胞，使之培养 24～48h 后达到 80%汇合。
10. 按第 8 步中确定的量将适量脂质体和约 100ng 纯化的 YAC DNA 混合（由第 3 步所得）。室温孵育 45min 使之形成脂质/DNA 复合体。

    胶纯化 YAC DNA 的浓度由乙啡啶琼脂板滴定测得（支持方案 3）。如果纯化的 YAC DNA 浓度未知，使用体积梯度（如 100μl、200μl、400μl、1000μl）

11. 加入 1ml 无血清培养基，用无血清培养基漂洗细胞一次，然后加入脂质/DNA 混合物。培养 4～18h（依细胞类型而异）。
12. 用含血清的完全培养基换液，培养 24～48h 至脂转结束。胰酶消化，将细胞传代（通常 1：2 或 1：4 传代）

    传代比例由生长率和 G418 敏感细胞死亡时间决定。传代后的细胞密度应保证 G418 敏感细胞死亡前没有过度生长。

13. 用含血清和 200～800μg/ml G418 的完全培养基培养。筛选、培养、扩增、鉴定转化细胞（基本方案 1）。

支持方案 1　通过同源重组将哺乳动物筛选标记引入 YACS

材料（标√的条目参见附录 1）

pDC47（ATCC＃87028；图 5.3.2）或其他带有 HIS3 突变筛选标记的 integrating 质粒

用于线性化 integrating 质粒的限制性内切核酸酶和缓冲液（图 5.3.2）

√TE 缓冲液，pH 7.5

带有 YAC 的 *HIS3* 突变酵母株

√SD 缺陷皿和培养基：SD-Ura-Trp 和 SD-Ura-Trp-His

√YPD 培养基

√乙酸锂/Tris/EDTA 溶液

√40% PEG 溶液

放射性标记的 *Neo*、*URA3*、*TRP1* 和重复元件的探针（表 5.3.2 放射性标记法；附录 3E）

√0.5μg/ml 溴化乙锭

Cla Ⅰ、*EcoR* Ⅰ和其他适用于分析转化产物的限制性内切核酸酶（图 5.3.2）

30℃温箱和摇床

Beckman 离心机和 TH4 转子

42℃水浴

硝基纤维膜和尼龙膜

X 光片

1. 用合适的限制性内切核酸酶线性化 20μg pDC47（如利用 *Pvu* Ⅰ位点将 pDC47 连入 YAC 载体臂或利用 *Sma* Ⅰ位点连入 *Alu* 序列区）；用乙醇沉淀 DNA，溶解在 20μl TE 缓冲液中，可将酶切产物浓缩。
2. 将 *HIS3* 突变的酵母株接种在 SD-Ura-Trp 皿上，30℃培养 3d，直至长出克隆。
3. 挑单个酵母克隆至装有 5ml YPD 培养基的 15ml 组织培养管中，30℃培养过夜至饱和生长。将 0.5ml 饱和培养物接种至 150ml 培养瓶中，加入 50ml SD-Ura-Trp 培养基，培养至 OD_{600} 达到 1～2（6～10h，依酵母株而异）
4. 室温 500*g*（使用 Beckman TH4 转子时，转速为 2000r/min）将培养物离心 5min，弃上清，加入 10ml 新配制的“乙酸锂/Tris/EDTA 溶液”，剧烈振荡重悬沉淀。重复沉淀、重悬 1 次。
5. 30℃静置培养 30min，4℃静置过夜。
6. 室温 500*g* 离心培养物。加入 1ml “乙酸锂/Tris/EDTA 溶液”，剧烈振荡重悬沉淀。分装成 100μl 每管，用于转化。
7. 取 3～10μg 线性化的 pDC47 DNA（溶于≤10μl TE 中，见第 1 步）至 100μl 酵母感受态细胞中。剧烈振荡 2s，30℃孵育 10min。
8. 每管加入 0.5ml PEG 溶液，中等速度轻轻振荡。30℃孵育 60min。
9. 42℃热激酵母细胞 5min。

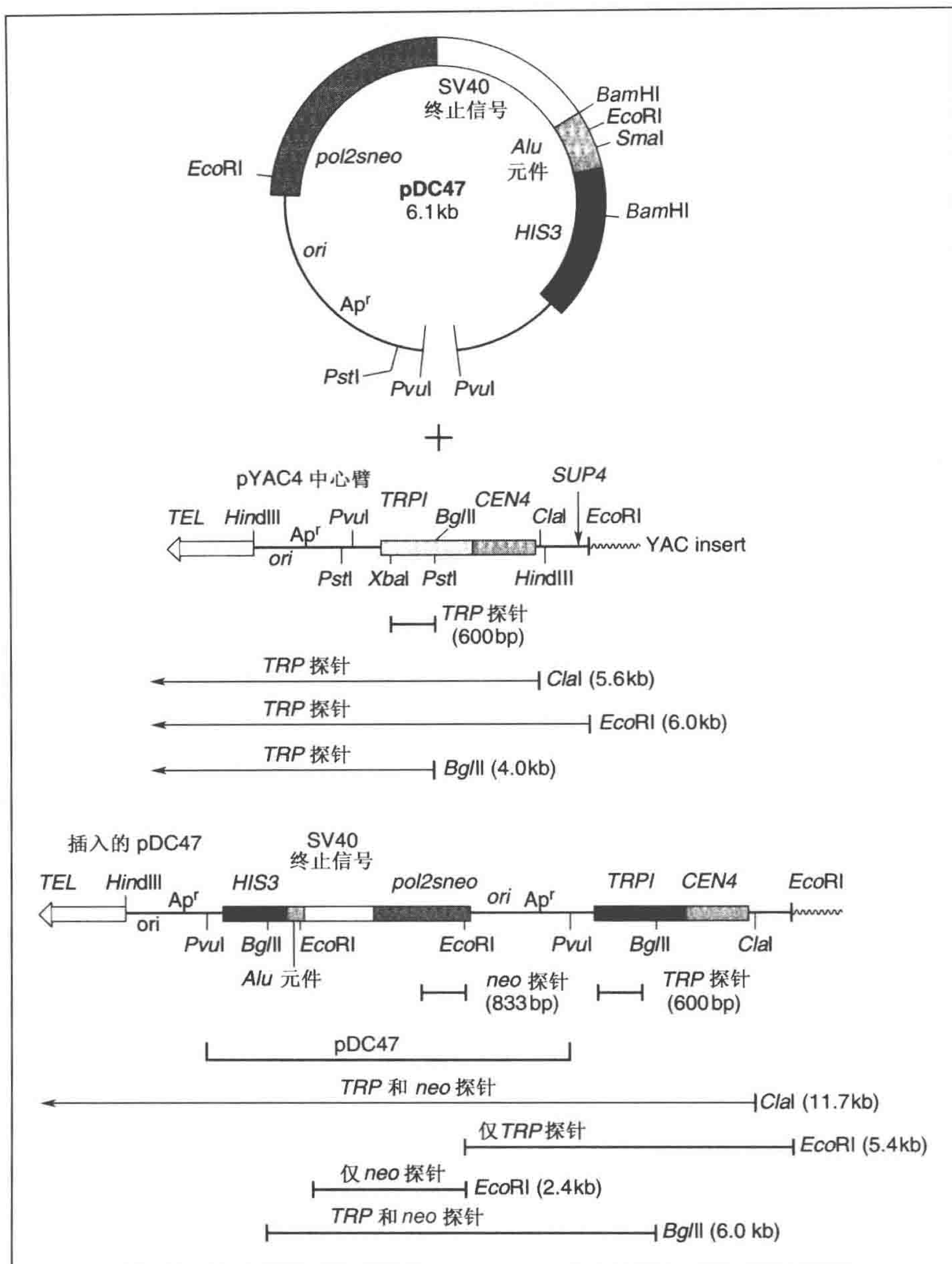


图 5.3.2　将 pDC47 质粒重组入 YAC。pDC47 所带 pol2 启动子控制下的 neo^r 标记基因可在胚胎干细胞中高表达。当 pDC47 被 *Pvu* Ⅰ线性化时，pYAC4 克隆载体中间臂的序列可作为整合的位点。未整合 pDC47 的 *EcoR* Ⅰ、*Cla* Ⅰ和 *Bgl* Ⅱ酶切片段长度如图所示。pDC47 与 pYAC4 整合改变了可以由 *TRP1* 和 *neo* 探针标记的酶切片段的长度。在 pDC47 与 pYAC4 整合后，*EcoR* Ⅰ、*Cla* Ⅰ和 *Bgl* Ⅱ酶切片段的 TRP1 探针识别片段分别为 11.7kb、5.4kb 和 6kb 条带。这些 *Cla* Ⅰ和 *Bgl* Ⅱ酶切片段也可由 *neo* 探针识别，正确整合可产生一个 2.4kb 信号带。由于酵母中端粒重复序列的扩增，包括端粒的限制性片段可比图中标示的稍长。

10. 室温下，加灭菌水至充满整管，振荡，高速点离5s。弃上清液，加入1ml灭菌水，中速振荡重悬酵母细胞。室温，高速点离5s。
11. 用50μl灭菌水重悬细胞，涂在SD-Ura-Trp-His琼脂皿上，30℃培养3～4d。
12. 将每个的酵母集落划线接种在1/8个SD-Ura-Trp-His琼脂皿上。30℃培养2～3d至克隆形成。
13. 挑 His^{+} Trp^{+} Ura^{+} 单克隆，在SD-Ura-Trp-His培养基中扩增。
14. 从单克隆酵母扩增物中抽提高分子质量DNA制备琼脂糖块（单元5.1）。以可以分离YAC分子大小的条件电泳分离染色体，同时电泳未转YAC的相应酵母细胞DNA和带有YAC的酵母细胞DNA作为对照。
15. 用溴化乙锭染胶，拍照，并印迹转移到硝基纤维膜或尼龙膜上。
16. 以放射标记的*neo*探针检测印迹膜。洗脱*neo*探针，依次使用放射性标记的*URA*、*TRP*和重复元件探针检测。每次杂交前，均应将印迹膜用X光片曝光12～24h，以保证前一探针已完全洗脱。
17. 用包括*Eco*RⅠ、*Cla*Ⅰ在内的限制性内切核酸酶酶切单克隆转化物，酶切产物跑琼脂糖胶分离，Southern印迹杂交。依次使用*neo*、*TRP1*和种属特异性重复DNA元件探针杂交、放射性自显影，洗脱后再次杂交。
18. 实验确定重复元件谱（repetitive-elememt “profile”）（基本方案1，第21步）。包括脉冲场电泳（PFGE）实验（第14步）中相同的对照。
19. 验证*neo*、*TRP1*探针检测到的条带大小是否与预期大小相符（图5.3.2），验证所得克隆的重复DNA元件谱与原YAC或重组YAC的重复DNA元件谱是否一致。

支持方案2　通过脉冲场电泳纯化YAC

材料（标√的条目参见附录1）

带有YAC的酵母株
√0.5×TBE缓冲液
低熔点胶（low gelling/melting temperature agarose）（如SeaPlaque GTG grade、FMC Bioproduct）
琼脂糖胶中的高分子质量标准指示物（单元5.1）
含0.1mg/ml溴化乙锭的0.5×TBE缓冲液
√透析缓冲液Ⅱ
10mg/ml多聚L-赖氨酸（poly-L-lysine）（Sigma；可选）
琼脂水解酶（New England Biolabs）或琼脂酶（Epicenter Techologies）
透析膜
专用凝胶灌制板（customized gel casting plate）（可选；图5.3.3）
预冷到4℃的脉冲场凝胶电泳（pulsed-field gel electrophoresis，PFGE）仪
带采图设备的短波中波紫外透照器
标尺（最好可激发荧光）
60℃和42℃热块（heating block）或水浴

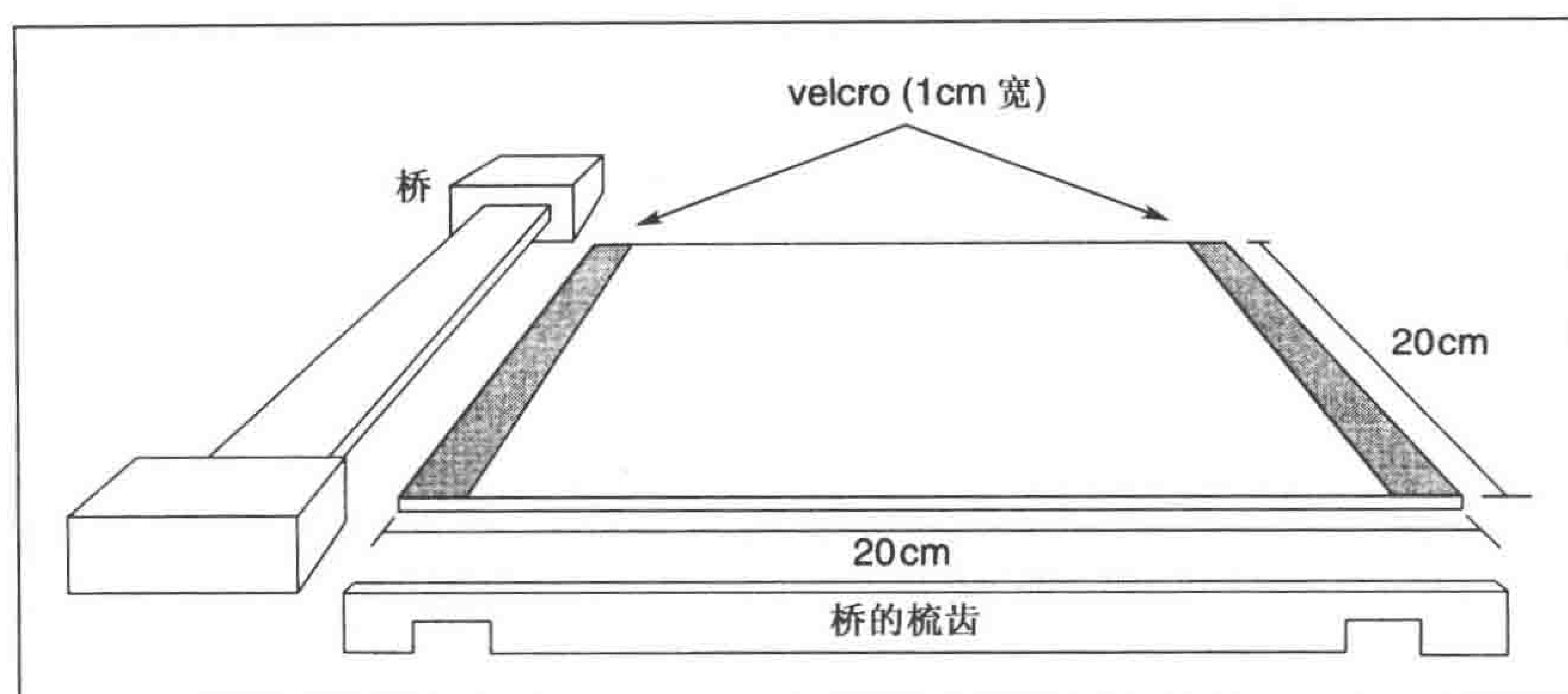


图 5.3.3　图示为带有 Velcro 条的制胶槽，用来做 PAGE。含有硅的平行 Velcro 胶条的挂钩与玻璃平板的边缘黏合在一起。琼脂糖倒入覆盖有 Velcro 的表面，梳子夹住 bridge，置于平板上。Velcro 钩可以保证胶固定在平板上。

1. 制备 YAC DNA 琼脂糖块，并在 0.5×TBE 缓冲液中透析（单元 5.1，支持方案 2；用 0.5×TBE 代替 TE 透析）。
2. 在 4℃冷房，用 0.5×TBE 缓冲液制备 0.5～0.8 的低熔点琼脂糖胶。用有一个大格的梳齿或将小格用胶带包裹，使凝胶中间有一个长点样槽，两边各有两个用于点分子质量标准的小槽。

   低熔点胶需 1h 才可凝固，凝固的胶柔软易碎且与灌制板黏附不佳。一个方法是使用边缘有尼龙搭链（Velcro）的玻璃灌胶板（图 5.3.3），凝胶与尼龙嵌合，当移动胶板时，胶板可起到固定支持凝胶的作用。另一方法是使用毛玻璃作灌胶板。

3. 通过三种电压的变化（总共 1000V）用 0.5×TBE 平衡琼脂糖胶 30min。通过纵长将 YAC DNA block 加入胶中，尽量使其靠紧，但不要使其出现明显的压缩。再用少许融化的琼脂糖胶（与制胶的胶相同）封住胶孔。在外部的孔中点入分子质量标准物。
4. 将玻璃板置于 PFGE 装置上，其中含有预冷的 0.5×TBE，让胶平衡 10～15min。在合适的参数下跑胶（改变时间、电压和跑胶时间），尽可能使感兴趣的 DNA 片段大小能够最大限度的跑开。
5. 电泳完成后，切去胶的左右两边，包括分子质量标准物和小部分的样品 DNA。小心地将胶移入成有 0.5×TBE 配成的 0.1mg/ml 溴乙啶的玻璃或塑料皿中，染色 30～60min。再换用 0.5×TBE 缓冲液去染色 30～60min。
6. 将胶置于 UV 扫胶仪（transilluminator）上，照相。在未染色的胶的任意一边放两把尺。在胶的横向上放置第三把尺用作尺寸的对照。用一把干净的手术刀将含有 YAC 条带的胶切出，呈条状，保证大小为 1cm×16cm。
7. 将切下的胶放入 50ml 离心管中，4℃下，用至少三种体积变化的透析缓冲液Ⅱ（30～40ml）透析 12h 以上。尽快使用 DNA（在几天至一个星期内）。如果 DNA 要用来做转染，加入 10μl 10mg/ml 多聚 L-赖氨酸。
8. 将胶分装成 0.5～2.0ml 一份，转入小的离心管内。65℃溶胶 10min，40℃下平衡 5min。加入 10U 的琼脂水解酶，轻轻混匀，40℃下水解 60～120min。为长期保存，55℃下热变性琼脂糖水解酶 10min。

支持方案 3　通过溴化乙锭/琼脂糖胶快速预测 DNA 浓度

材料（标√的条目参见附录 1）

0.8%（*m/V*）琼脂糖含 H_2O

√10mg/ml 溴化乙锭

1μg/μl DNA 储存液（冻存；若没有污染，可以反复解冻）

未知 DNA 样品

60mm 直径的佩特里细菌培养皿（petri plates）

1. 制备 100ml 0.8%琼脂糖。冷却至 50℃，加入 10μl 10mg/ml 溴化乙锭。搅拌混匀，倒入 8 个 60mm 直径的佩特里细菌培养皿中。室温下 2～3h 使其变硬变干。用 Parafilm 包裹，4℃下保存少于 1 个月。
2. 用 1μg/μl 储存液配制 7 个 1∶1 系列的稀释液，提供 8 个标准溶剂，浓度从 1μg/μl 至 7.8ng/μl 不等。取 0.5μl 每一种标准溶液和 0.5μl 未知 DNA，以分散的点加入到溴化乙淀/琼脂糖平板上。保持 15min。
3. 在 UV 扫胶仪上照相。通过未知浓度和标准稀释度的不同荧光强度的比较，预测浓度。

基本方案 2　将细菌人工染色体（BAC 或 PAC）引入到哺乳动物细胞和小鼠胚胎中

材料（标√的条目参见附录 1）

√含有合适的抗生素的 LB 培养基（选择培养基）

RNase A（Sigma）

Qiagen Midi-prep 试剂盒（Qiagen），包含以下试剂：

P1 缓冲液

P2 缓冲液（使用前，确认 SDS 已经完全重悬了；若还是沉淀，在 37℃下预热）

P3 缓冲液，预冷

Midi-tip 100 个体积

QBT 缓冲液

QC 缓冲液

QF 缓冲液，预热到 65℃

异丙醇

√原核的注射缓冲液（PIB）

纯化的 BAC DNA 或含有线性化的 BAC DNA 的 PFGE 胶（支持方案 2）

√透析缓冲液 I

70%乙醇

小鼠胚胎（和转核装置）

哺乳动物细胞

灭菌素（ICN Biomedical）溶解在完全培养基里，配成 1～4μg/μl 的 1000×溶液

37℃细菌培养箱

高速离心机（如 Sorvall RC 系列的带有 GSA 转子或同等的转子）

50ml 高速离心管

15ml Corex 玻璃离心管

1. 从选择性平板中挑取一个克隆，接种到 5ml 含有合适的抗生素的 LB 培养基中。在 37℃摇床上培养几个小时，直至混浊。
2. 加入 100ml 选择性介质并与 0.5ml 起始液温育，在 37℃培养 14h，并轻微振荡（200r/min）。
3. 将培养液分装入两个 50ml 的高效离心管中，4℃，4500*g* 离心（约相当于 5500r/min）20min，弃上清保留沉淀。
4. 将 0.2g RNase A 溶解于 20ml P1 缓冲液中，分装入两个管内各 10ml P1 和 RNase 缓冲液。再分别在每个管内加 10ml P2 缓冲液，温和地摇晃数次使其完全混合，在室温放置 5min。
5. 加 10ml 预冷的 P3 缓冲液，并迅速温和地摇晃数次使其完全混合。冰浴 15min。在 4℃ 20 000*g*（13 000r/min）离心 15min，迅速将上清倒入干净的管内，并再次离心。在两个管内保留上清。
6. 根据生产商提供的指示将 4ml QBT 缓冲液加入 Qiagen Midi-tip 100 柱子中，并使其通过重力流过介质。用 10ml QC 缓冲液清洗柱子 2 次。
7. 通过加入预热在 65℃的 1ml QF 缓冲液将 DNA 溶解在 15ml 的玻璃离心管中。重复 4 次（共 5ml）。加入 3.5ml 的异丙醇并在 4℃下 15 000*g*（11 500r/min）离心 30min，弃上清，保留沉淀。
8. 轻柔加入 2ml 70%乙醇（室温），4℃ 15 000*g*（11 500r/min）离心 10min。弃上清，空气干燥沉淀 10min。用 200μl PIB 溶解 DNA。用分光光度计测定 DNA 浓度（附录 3D）。
9. 如果希望，根据支持方案 4 线性化及胶纯化 BAC DNA。

10a. 将 BAC DNA 导入小鼠胚胎：用 100μg/ml PIB 重悬 DNA。在合格的转基因核心仪器上进行显微注射。

10b. 转染培养哺乳动物细胞：用 pPAC4 或 pBACe3.6 载体生成的 BAC，按照可选方案中步骤 5～8 进行脂质体转染，对于步骤 8 中的 G418，加入 1～4μg/ml 灭瘟素（使用 1000×储液），最敏感的细胞将在 1 周内被杀死。

11. 从抗灭瘟素细胞或转基因小鼠中制备基因组 DNA，用于 PCR 和 Southern 印迹。
12. 通过 PCR 或 Southern 印迹确定 BAC 中是否存在已知基因或标志，以检测 BAC 上的标志和接受细胞系中的等位基因间的多态性。利用临近载体的分子探针（BAC 中的插入结点）估计拷贝数。

支持方案 4　线性化 BAC 和胶纯化 BAC

材料（标√的条目参见附录 1）

BAC DNA（基本方案 2，步骤 8）

Not I 或 *Asc* I 限制酶及适当的缓冲液

√透析液 I

β-琼脂糖水解酶

25∶24∶1（V/V/V）苯酚/氯仿/异戊醇

24∶1（V/V）氯仿/异戊醇

√3mol/L 乙酸钠

100％乙醇

√原核注射缓冲液（PIB）

50ml 锥形管

1.5ml 微量离心管

40℃、55℃和 65℃水浴

1. 为了确定插入基因是否包含 *Not* Ⅰ 或 *Asc* Ⅰ 抑制位点，在酶生产商推荐的环境中用含有 10U 抑制酶的缓冲液消化 5μg BAC DNA。
2. 加载一个脉冲域凝胶并在合适的环境下跑胶，这样可以分辨 5～200kb 的片段。用 EB 染胶、显影，然后确定片段大小（具体程序见单元 5.1）。

   在大多数的 BAC 载体中，如果插入的片段不存在 *Not*Ⅰ的作用位点，此时可出现 2 个条带，它们分别是载体的条带（典型的片段大小为 11～20kb）和插入的条带（典型的片段大小为 80～200kb）。同样，对于 pPAC 载体，如果插入片段不存在 *Asc*Ⅰ作用位点，此时可出现 2 个条带，它们分别是 2.4kb 大小的间隔的载体条带和 14.3kb 的插入片段以及附加的载体片段。对于 pBACe3.6 载体中的 *Asc*Ⅰ，如果插入片段不存在*Asc*Ⅰ作用位点，会有一个条带大小是插入片段长度加 11.5kb 载体（*Asc*Ⅰ切割载体一次）。总之，附加条带的出现说明插入片段已经被酶切割，而且 BAC 不能线性化使用那个酶。如果插入片段被两种酶切割，环状 BAC 必须在后续步骤中使用，所得结果将在后面讨论。
3. 用合适的抑制酶消化 20μg BAC DNA。消化完成后，加入凝胶加样缓冲液。
4. 为脉冲场凝胶电泳实验准备一块低熔点凝胶（基本方案 2）。将其放入电泳仪后，载入 BAC DNA 作为常规凝胶。进行支持方案 2 的第 6 步。
5. 将包含 BAC 的凝胶切片转移至 50ml 锥形管中，在 4℃环境下透析 10～12h。
6. 移除所有透析缓冲液，在 1.5ml 微量离心管中将凝胶切割成小的片段。65℃加热离心管 15～20min，直至熔解完全，然后放 40℃环境均衡 5min。
7. 加入 10U β-琼脂糖水解酶，用移液管头轻轻混匀。温浴 60～120min，直至没有固体琼脂糖为止。如果 120min 后仍然存在琼脂糖颗粒，再次放 65℃溶解和 40℃冷却，加入 10U 琼脂糖水解酶，继续温浴。
8. 将 β-琼脂糖水解酶置于 55℃加热使其失活。用 25∶24∶1 苯酚/氯仿/异戊醇提取 DNA 一次，再用 24∶1 氯仿/异戊醇提取 DNA 两次（附录 3B）。加入 0.1 体积的 3mol/L 乙酸钠，再加入 2 体积 100％乙醇置于－20℃ 30min 使 DNA 沉淀。
9. 在最高速度下微量离心使 DNA 复性。完全倒出乙醇，风干沉淀物 30min。在 100μl PIB 中重悬。均分后，取一份 DNA 样本在脉冲电场中电泳，再用 Southern blot 检测纯化 BAC DNA 的完整性。

参考文献：Antoch et al.，1997；Cabin et al.，1995；Huxley et al.，1991；Pavan et al.，1990；Sikorski and Hieter，1989

编　　者：Roger H. Reeves，Deborah E. Cabin，Bruce Lamb，and William M. Strauss

单元 5.4 BAC/PAC 文库的构建

本部分所用载体在图 5.4.1 中列出。

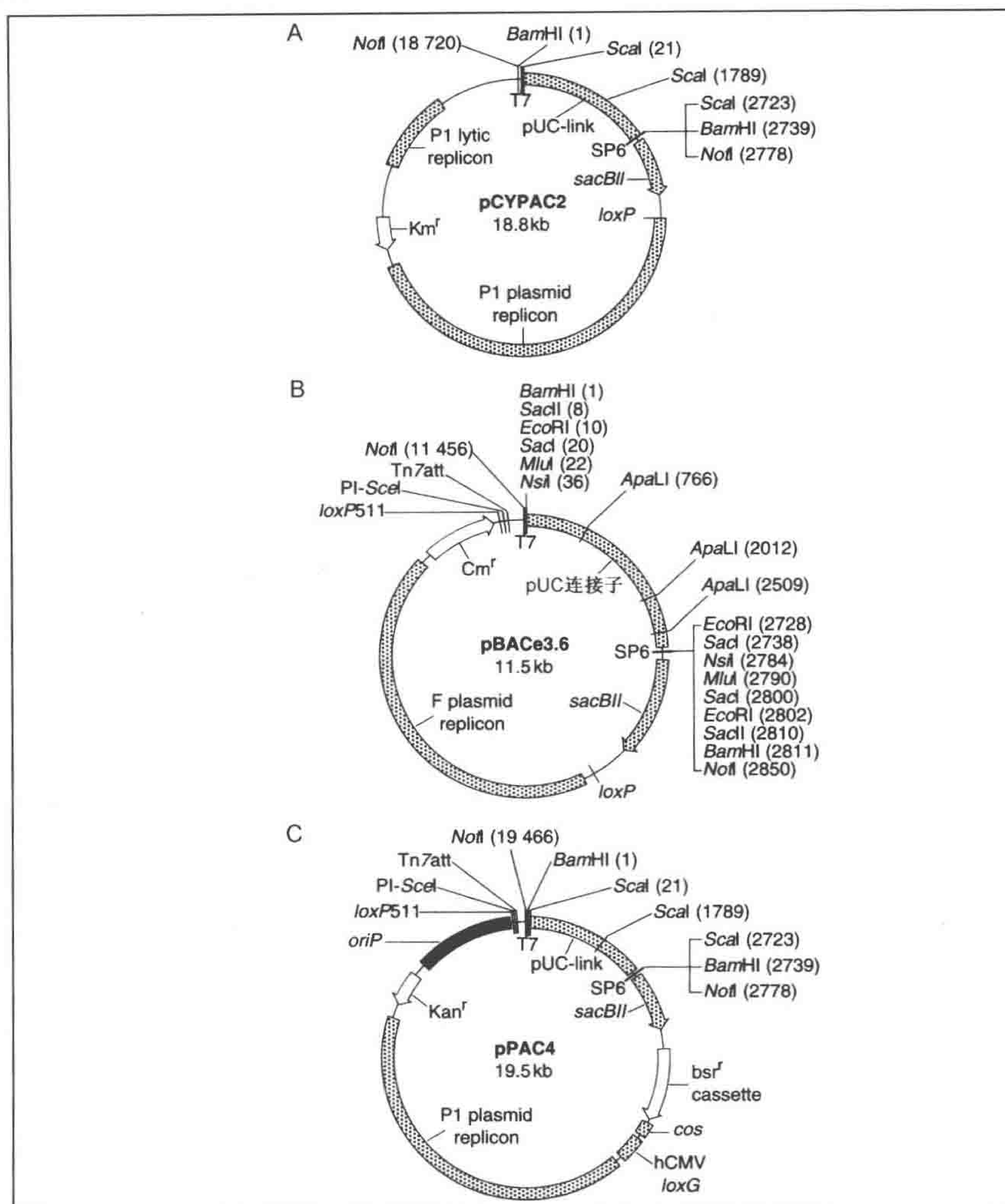


图 5.4.1 pCYPAC2 (A)、pBACe3.6 (B) 和 pPAC4 (C) 载体对插入克隆片段的优化选择具有普遍的特征。包含该插入片段的大肠杆菌细胞在含有蔗糖的培养基中能够比那些没有包含该插入序列的质粒细胞要生长得好，在这三种载体中，蔗糖在蔗糖 6-果糖基转移酶（果聚糖蔗糖酶）作用下被转化成为有毒的代谢产物。蔗糖 6-果糖基转移酶（果聚糖蔗糖酶）由 *sacB*Ⅱ基因编码激活。PUC 连接子序列包含着有功能的高拷贝的质粒。这些质粒具有氨苄抗性基因（Ap^r；不表达）。在克隆的程序中，被酶消化的基因组的 DNA 片段移除掉 PUC 连接子序列同时自身将该片段替换到 PAC 和 BAC 的克隆中。在克隆中，*LoxP* 重组位点不起作用。A. pCYPAC2 载体包含 P1 质粒复制子，主要是重组子克隆，以维持大约在 1 个细胞中有一个这样的拷贝。选择性的 P1 溶解的复制子能够被诱导以准备更高级的拷贝数，通过增加 IPTG 诱导进入培养基。卡那霉素抗（药）性基因 Km^r 也存在于载体中。B. pBACe3.6 载体包含对氯霉素抗性基因 Cm^r 和 F 质粒复制子，以维持重组子克隆大约在 1 个细胞中有一个这样的拷贝。多克隆位点侧翼 PUC 连接子片段允许为克隆插入物利用任何限制性内切核酸酶的识别序列 *BamH*Ⅰ、*Sac*Ⅱ、*EcoR*Ⅰ、*Sac*Ⅰ、*Mlu*Ⅰ或者 *Nsi*Ⅰ进行正向选择，Tn7att 序列允许特异的基于 Tn7 的 BAC 克隆不断翻新。C. pPAC4 载体包含从 pCYPAC2 带来的 4 个要素：P1 质粒复制子、Km^r 基因、*sacB*Ⅱ基因和 PUC 连接子。P1 质粒复制子确保低拷贝数以维持重组子克隆，P1 溶解的复制子被移除，另外，具有促进 PAC 克隆的利用作用的有基因的继续功能分析的 *oriP* 和 bs^r cassette 基因，也成为该种克隆插入物，Tn7att 序列也存在，并能特异性地使 PAC 不断翻新。

注： 为避免剪切力损伤，在所有操作 gDNA 的步骤中使用灭菌的宽口枪头。

基本方案

材料（标√的条目参见附录 1）

≥2～10ng/μl 尺寸分割的 *Mbo* Ⅰ或 *Eco*R Ⅰ消化的基因组 DNA（支持方案 4）

为克隆准备 10～50ng/μl pBACe3.6、pCYPAC2 或 pPAC4 载体 DNA（支持方案 1）

√1 Weiss U/μl T4 DNA 链接酶和 5×缓冲液（Life Technologies；见附录 1 缓冲液）

√0.5mol/L EDTA，pH 8.0

10mg/ml 蛋白水解酶 K

√100mmol/L PMSF 缓冲液

√TE 缓冲液，pH 8.0

TE/PEG 溶液：0.5×TE 缓冲液，pH 8.0，含 30%（*m*/*V*）聚乙二烯 8000（PEG 8000）

电转化感受态细菌细胞（DH10B；Life Technologies）

√SOC 培养基（Life Technologies；同样见附录 1，但将酵母提取物浓度降至 0.5%）

√LB 平板包含 5%（*m*/*V*）蔗糖以及 25μg/ml 卡那霉素（用于 PAC 克隆）或 20μg/ml 氯霉素（用于 BAC 克隆）

100mm×15mm 平皿用于测试转化

22cm×22cm 浅皿用于挑克隆

√LB 培养基包含 25μg/ml 卡那霉素（PAC 克隆）或 20μg/ml 氯霉素（BAC 克隆）

Not Ⅰ限制酶和缓冲液（New England Biolabs）

1%（*m*/*V*）琼脂糖溶液（超级纯）（Life Technologies）

√0.5×TBE 缓冲液

小分子质量 PFG markers 包含 λ-*Hin*dⅢ片段和 λ 多能体的混合物（New England Biolabs）

√0.5μg/ml 溴化乙锭在 0.5×TBE 缓冲液内

80%（*V*/*V*）甘油，灭菌

干冰/乙醇浴

16℃和 37℃水浴

0.025μm 孔径的激孔透析膜（Millipore），25mm 和 47mm 的直径宽口枪头，灭菌一次性激电穿孔浅管，0.15cm 盖子（Life Technologies 或同等产品）

电转仪（带电质升质设备的细胞穿孔装置，Life Technologies 或同等产品）

15ml 带盖的离心管，灭菌

轨道混合器，37℃

自动质粒隔离系统（AutoGen740，综合分离系统，可选择）

软质塑料 96 孔板（成型夹具）

1. 由 *Mbo* Ⅰ或 *Eco*R Ⅰ消化的基因组片段，每 120～300kb 最大用 50ng（支持方案 4），由 *Bam*H Ⅰ或 *Eco*R Ⅰ消化的片段和脱磷酸 pBACe3.6 载体 DNA 用 25ng 或由 *Bam*H

Ⅰ消化的和脱磷酸 pCYPAC2 或 pPAC4 带菌 DNA 用 50ng（支持方案 1）。包括连接控制（仅与菌反应或无连接酶）。

第 1～14 步相当于小规模预实验载体和插入片段按 10∶1 质量比进行，并使用低的 gDNA 终浓度（1ng/μl），证实产生的连接体多于自连体。

2. 每管加 10μl 5×T4 DNA 连接酶缓冲液和无菌水至总量为 50μl，混合时要非常轻柔。加 1Weiss 单位 T4 DNA 连接酶并温浴在 16℃中 4h 用于 *Eco*RⅠ-*Eco*RⅠ克隆，或温浴 8h 用于 *Bam*HⅠ-*Mbo*Ⅰ克隆。
3. 终止反应，加 0.5mol/L 的 EDTA 1μl，pH8.0，并加 10mg/ml 的蛋白酶 K 1μl 温浴在 37℃中 1h。为抑制蛋白酶 K 活性，加 100mmol/L PMSF 1μl 混合并温浴在室温中 1h。
4. 将绑扎混合物放置在一个直径 25mm、0.025μm 孔的微量分析过滤器中央与无菌蒸馏去离子水混匀，共同置于一有盖培养皿中。在室温中透析 2h。
5. 小心地使透析绑扎混合物复原，并利用无菌广孔移液枪将其转移到微量离心机管中。从 petri 盘中弃上清液并加入约 15ml TE/PEG 混合液于盘中。将 empty membrane（空膜）放置在这层混合液上，将绑扎混合物退回到膜上，并继续在室温中透析 5h（或在 4℃中过夜），直到平衡。
6. 将膜转移到有盖培养皿中，利用无菌广孔移液枪复原绑扎混合物，并将其转移到微量离心机管中。保持冰冻并尽快转化到大肠杆菌中。
7. 预冷一次性微量电穿孔透明管。解冻（在冰中）所需量的 electrocompetent 细菌细胞：$(n+1)\times 2\mu l$ 细胞，n 是电穿孔的数目。将其转换成二倍体或三倍体。加 20μl 等份量入预冷的微量离心机中。保持在冰中。
8. 用无菌广孔移液枪，移 2μl 绑扎混合物到每一个等份量中，并轻柔地用移液枪混合。将该混合液转移到预冷的电穿孔，小心地加入一小滴在电极间，并避免有任何气泡产生。将该小管放置入电穿孔室中，并根据以下条件释放脉冲。

   电压设置：

   电阻，4000Ω；

   细胞穿孔设置：

   电压梯度，13kV/cm；

   电容，330μF；

   电阻，低 Ω；

   充电速率，快速。
9. 收集的细胞液滴立即稀释到置于 15mL 的带盖的聚苯烯管中的 500μl SOC 培养基中，在 37℃，200r/min 的摇床中温育 1h。
10. 分散部分细胞于含 5％蔗糖和 20μg/ml 氯霉素（BAC 克隆）或 25μg/ml 卡那霉素（PAC 克隆）的 100mm×15mm LB 培养皿中。使培养皿的盖朝下以加速干燥。过夜培养，计数克隆数并估计转化滴度。
11. 用牙签挑 40 个克隆接种于 1.5ml 含 5％蔗糖和 20μg/ml 氯霉素（BAC 克隆）或 25μg/ml 卡那霉素（PAC 克隆）的 LB 培养基中培养过夜。采用自动质粒分离系统（AutoGen740）或修改的碱裂解法（见支持方案 5）。

12. 把（0.5～1μg）DNA融于100μl TE中。以0.1U的*Not* Ⅰ消化5～10μl的DNA于20μl体系中，以分离载体和DNA插入片段。用96孔板在37℃反应2h。
13. 使用CHEF或FIGE设备分析消化的DNA。采用1%琼脂糖，0.5×TBE缓冲液，低范围PFG标记，及以下条件：
    CHEF：14℃，6V/cm，16h，0.1～40s的脉冲，CHEF 120°角；
    FIGE：室温，180V前向电压，120V反转电压，16h以0.1～14s线性转化。
14. 用0.5μg/ml的溴化乙锭溶液染胶，使用数码图像估算插入片段的分子质量。

    大多数克隆将产生载体带（pBACe3.6为8.7kb，pCYPAC2为15.5kb和pPAC4为16.8kb）和插入片段。如果插入包含了*Not* Ⅰ位点，会看到除此以外的带。不完全消化会产生特征性的双联体，两条带的载体大小不同。

    15～20步为构建文库的放大过程。

15. 使用合适大小和连接效率的基因组DNA片段重复连接过程。用电洗脱的插入DNA放大连接反应到500～1000μl，以250μl每管，分2～4管进行。
16. 每250μl用47mm直径的微滤膜过滤以透析富集连接混合物（富集后每滤膜产生约40μl连接混合物）。
17. 把12μl富集DNA加入含110μl细胞的管中。解冻足够的感受态细胞使用所有连接混合物完成所有转化。
18. 室温下以每次电转20μl进行转化并收集10次转化的细胞到50ml含5ml SOC溶质的离心管中。在37℃，200r/min温育1h。
19. 每孔加800μl 80%无菌甘油和混合物。涂布200μl在2个含5%的蔗糖和适当的抗生素的100mm×15mm LB培养皿中以检测每管滴度。
20. 采用干冰/乙醇浴冻存剩余的细胞，保存在－80℃直到需要复苏挑克隆。挑克隆时，用22cm×22cm的培养板按照1600个克隆每板进行分散培养。包含5%蔗糖和适当抗生素的LB培养板。37℃培养过液，冻存的细胞可储存至1年。

支持方案1　克隆用BAC/YAC载体的制备

附加材料（见基本方法，标√的条目参见附录1）

携带pBACe3.6、pCYPAC2或pPAC4的*E. coli* DH10B细胞（P. de Jong）

√LB培养板，分别包含

　25μg/ml卡那霉素（PAC用）或20μg/ml氯霉素（BAC用）

　5%（*m/V*）蔗糖和卡那霉素或氯霉素

　5%（*m/V*）蔗糖，100μg/ml氨苄青霉素和卡那霉素或氯霉素

*Bam*H Ⅰ和*Eco*R Ⅰ限制性内切核酸酶及其10×缓冲液（New England Biolabs公司或相应厂家）

0.7%（*m/V*）琼脂糖凝胶（标准电泳）

牛小肠碱性磷酸酶（AP；Boehringer Mannheim）

10mg/ml蛋白酶K（Boehringer Mannheim）

95%（*V/V*）乙醇

1.0%（m/V）琼脂糖溶液（超纯；LifeTechnologies；CHEF 系统用）

√不包含二甲苯苯胺 FF 的 6×凝胶上样缓冲液

1kb ladder 或 λ *Hind*Ⅲ DNA maker

T4 多聚核苷酸激酶（New England Biolabs）

30%（m/V）聚乙二醇 PEG8000

1.5mm 厚的电泳梳子

直径 3/4in 的透析管，MWCO 为 12～14kDa（LifeTechnologies 或相应厂家）

透析夹

1. 为检测载体 DNA，将携带 BAC 或 YAC 载体的大肠杆菌 DH10B 细胞划线接种到含有氯霉素或卡那霉素的 LB 培养板上，37℃培养过夜。
2. 挑取 5 个克隆，接种到含有 3ml LB 液体培养基（含有适当抗生素）的 15ml 聚丙烯管中，37℃培养过夜。
3. 取上述 1.5ml 培养物，用自动质粒抽提系统（AutoGen740）或改良碱裂解法（支持方法 5）抽提质粒。剩下的培养物储存于 4℃。
4. 用 100μl TE 缓冲液重悬 DNA。分别取 5μl DNA，各用 *Not*Ⅰ、*Bam*HⅠ和 *Eco*RⅠ单独进行酶切消化（采用手册推荐的酶切条件）。用 0.7%琼脂糖凝胶电泳分析酶切结果。丢弃其中任何含新发生重组的载体。

   PAC 载体不包含 *Eco*RⅠ酶切位点。另外，所有的酶都可以从载体中酶切出 pUC19 相关片段，产生约 2.7kb（pUC19 填充片段）、约 8.7kb（pBACe3.6）、15.5kb（pCYPAC2）或 16.8kb（pPAC4）片段。
5. 选择其中一个克隆的培养物，稀释到含有适当抗生素的 LB 培养基中，37℃培养至饱和。采用标准方法（如 CPMB 单元 1.7 和 1.8），通过碱裂解法或清洁裂解法制备粗制 DNA，再用 CsCl/EB 平衡离心纯化。
6. 为明确完全酶切消化 DNA 的最小酶量，分别用 0.1、0.2、0.5、1.0U 的酶（BAC 或 YAC 载体用 *Bam*HⅠ；pBACe3.6 载体则用 *Eco*RⅠ）酶切消化 50ng 载体DNA，10μl 反应体系，37℃，1h。琼脂糖凝胶电泳和 EB 染色分析酶切结果。
7. 为明确酶切消化最大量 DNA 所需体系（将最小量按比列增大体积），在 10μl 反应体系中酶切消化 100ng、200ng 和 400ng 的载体 DNA，每个条件的 DNA 均采用上述最小酶量的 2 倍、4 倍和 8 倍的量，即共 9 个反应体系，37℃，1h。琼脂糖凝胶电泳和 EB 染色分析酶切结果。
8. 根据上述条件，在约 30μg 的载体 DNA 中加入适量的酶，37℃反应 15min。再加入 1U 牛小肠碱性磷酸酶，37℃继续孵育 1h。在反应体系中加入 0.5mol/L EDTA 至终浓度 15mmol/L、10mg/ml 蛋白酶 K 至终浓度 200μg/ml，37℃继续孵育 1h 终止酶切。
9. 加入 100mmol/L PMSF 至终浓度 2mmol/L，室温孵育 1h 终止蛋白酶 K 的作用。在孵育期间，用 95%乙醇清洁 1.5mm 厚的电泳梳子，用高压灭菌指示胶带制备电泳槽，保留足够的上样空间和两侧的 Maker 上样孔。
10. 用上述准备的梳子在 CHEF mold 中制备 1%的琼脂糖凝胶，当胶凝固时，加 2L 0.5×TBE 缓冲液至 CHEF 电泳槽中，平衡温度至 14℃。

11. 将胶转移至预冷的电泳装置中。加6×凝胶上样缓冲液至样品中并上样，同时在两侧的加样孔中上1kb ladder或λ *Hind*Ⅲ DNA maker。电泳：14℃、6V/cm、0.1～40s脉冲、120°角电泳16h。
12. 切下两侧包含Marker和部分中央区域含有样品的凝胶，EB染色检测载体片段。剩下的胶用塑料膜包好置于4℃保存。
13. 从中央泳道中切下线性的不含有pUC填充片段的载体DNA，用电洗脱回收（支持方案4）。将样品置于直径3/4in的透析管（MWCO为12～14kDa）中，用1L TE缓冲液，4℃透析2h以上。透析溶液中的DNA采用乙酸钠和乙醇或异丙醇沉淀（附录3B）。将DNA溶解于TE缓冲液中。
14. 为检测去磷酸化效果，将4个微离心管（分别标记1、2、3、4）置于冰上，加4μl 5×T4连接酶缓冲液、50ng酶切和AP处理的载体DNA至管中，用灭菌水调整体积至20μl。
15. 加1U T4多聚核苷酸激酶至3号和4号管，37℃孵育1h，65℃处理20min，然后冰浴。加1U T4 DNA连接酶至2号管和4号管，然后4个管子于16℃孵育4h以上。
16. 将上述样品于0.7%琼脂糖凝胶中电泳，EB染色分析结果。

    环状DNA不应该出现在1、2、3号管中。4号管应该有环状DNA，但没有线性DNA。

17. 用所有剩余的载体DNA溶液加入4U的T4 DNA连接酶配成总量200μl的反应体系做连接，然后用CHEF设备（参见第10～13步）中的PFGE从背景中将单体DNA从连接载体中分离和纯化出来。
18. 单独用载体DNA（25ng pBACe3.6，50ng PAC载体）和加入了50ng对照DNA的载体（参见基本方案，第1～3步）做连接测试。透析水和30%的PEG8000，按照基本方案第4～9步的描述进行转化。
19. 在含5%蔗糖和卡那霉素或氯霉素等其他合适的抗生素的LB平皿上涂转化的细胞，37℃过夜。

    这些平板是用于测定重组和未重组克隆的水平。如果得到单独载体DNA的克隆数量高（>100），载体必须从步骤6的酶滴定开始重新制备。如果质粒被从背景克隆中分离出来，并在用*Not*Ⅰ消化后用PFGE分析，那么能够观察到较小的载体。也有可能，星号活性造成了*sacB*基因的非特异性分解（包括启动子和编码序列），因而使该基因失活，而且特异性分解、未去磷酸化的DNA自连接成环状。因此，这些克隆不用插入DNA就能在蔗糖平皿上存活。

20. 为了测定填充片段的碎片已被完全从载体中去除，在含有5%蔗糖和100μg/ml的氨苄青霉素或卡那霉素或其他合适的抗生素的LB平皿上涂布含有自连载体的转化细胞。37℃过夜。

    这些平板是用于测定含有pUC连接子的未分解载体的残余水平，最好是没有Amp^R抗性的克隆。

支持方案 2　从包埋在琼脂糖胶中的淋巴细胞提取高分子质量 DNA

材料（标√的条目参见附录 1）

　健康的志愿者
√冰上欲冷的 PBS
√1×RBC 裂解液
　InCert 琼脂糖（FMC Bioiproducts）
√蛋白酶 K
√TE_{50}：10mmol/L Tris · Cl（pH 8.0），50mmol/L EDTA（见试剂的配方）
√0.1mmol/L PMSF：使用前把 100mmol/L PMSF 以 1/1000 的比例稀释到 TE_{50}
√0.5mol/L EDTA（pH 8.0）
　取血设备
　血液收集试管（装有 EDTA）
　血细胞自动计数仪
　圆锥形的含螺旋盖子的 50ml 聚丙烯离心管，无菌
　能制冷的离心机，适合 50ml 离心管的转头（如配有 H-1000B 转头的 Sorvall R16000D）
　转鼓仪（Robbins Scientific 或其他公司）
　可调至 50℃的水浴装置
　10mm×5mm×1.5mm 的一次性 DNA plug mold（Bio-Rad）

1. 用取血设备从健康志愿者身上取 45ml 静脉血，并装到含 EDTA 的储血用离心管，混合以防血液凝集。用全自动血细胞计数仪计数淋巴细胞细胞总数（45ml 血的细胞数应为 2.25×10^8～3.3×10^8 个）
2. 把血转移到两个圆锥底、螺旋盖的 50ml 聚丙烯离心管，每管分别加入 10ml 冰上预冷的 PBS，轻轻地混匀。4℃，1876*g* 离心 5min。用一次性 10ml 吸管去掉上清，操作要小心，不要吸去淋巴细胞。用冰上预冷的 PBS 重复洗 10 遍。
3. 去掉上清，混匀细胞悬液，并分装到 4 个 50ml 离心管。每管加入 25ml 1×RBC 裂解液，在转鼓仪上混合均匀，室温下转鼓 20min。
4. 观察 RBC 的裂解过程（RBC 裂解时混浊慢慢消失）。变清亮后（通常<30min），4℃ 208*g* 离心 10min，轻轻地倒去上清，小心不要破坏淋巴细胞沉淀。用 2ml 冰上预冷的 PBS 冲洗离心管的内部，小心不要破坏淋巴细胞沉淀。用微量移液器吸去上清。
5. 加入 10ml 冰上预冷的 PBS 使淋巴细胞重悬，并把细胞悬液集中到一个 50ml 离心管。4℃ 208*g* 离心 5min，小心地倒掉上清以除去大部分裂解后残存的碎片。重复洗涤直到大部分红细胞被除去。用冰上预冷的 PBS 重悬沉淀使细胞密度为 1×10^8 个/ml（约 600μg DNA/ml）。
6. 取 0.1g InCert 琼脂糖到 10ml PBS（1%），微波炉中加热熔解，并存放在 50℃水浴中。把细胞悬液混合均匀，并取 400μl 到一微量离心管。用手温暖微量离心管 3min。加入 400μl 溶化的 1% InCert 琼脂糖，轻轻地混匀，并用微量移液器迅速转移到

10mm×5mm×1.5mm 的一次性 DNA plug mold（45ml 血最终生产约 45 个 plug）。应避免产生气泡。

7. 把 mold 放在冰上冷却 30～60min 使琼脂糖凝固。把 plug 从 mold 中取出并直接加到一装有 50ml 蛋白酶 K 裂解液的 50ml 离心管（每管加入的 plug 少于 50 个）。
8. 离心管 50℃水浴 48h，间歇地摇动离心管。水浴 24h 后用新鲜的蛋白酶 K 裂解液置换原先的蛋白酶 K 裂解液。用无菌的去离子水冲洗 plug 几遍。
9. 加入 50ml TE50，4℃，转鼓 24h，其间 TE50 至少要更换 2 次。为了使蛋白酶 K 失活，用 50ml 0.1mmol/LPMSF 洗 2 次，每次 4℃转鼓 2h。用 TE_{50}复洗 1 遍。
10. 把 DNA plug 保存在 0.5mol/L EDTA 中，存放在 4℃（至少可保存一年）。

支持方案 3　从包埋在琼脂糖胶中的动物组织细胞中提取高分子质量 DNA

虽然从培养的细胞系（支持方案 2）提取的 DNA 以被广泛用于构建柯斯质粒文库，但细胞的传代有可能导致染色体的重排。同时，通常很难从小的模型动物（如小鼠、大鼠）获得足够的淋巴细胞。这里提供一种从动物组织（如脾、肾和脑都是高分子质量 DNA 的好来源）提取高分子质量 DNA 的替代方法。

附加材料（见支持方案 2）

健康动物（如出生约 5 星期的小鼠、大鼠）
无菌的解剖工具
无菌的 Dounce 匀浆器
无菌的 15ml 圆锥底部，螺旋盖的聚丙烯离心管（Coring 或其他公司）
计数器（CVW）

1. 小鼠或大鼠放进装有 CO_2 的塑料袋中或干燥器中，使其窒息而死。用锋利、无菌的剪刀迅速地取下所需的组织（如脾、肾、脑），并且转移到置于冰上的培养皿中。用冰上冷却的 PBS 冲洗，并用无菌的镊子除去脂肪和其他附属组织。
2. 取 1 或 2 个脾、肾或脑到冰上预冷的无菌 Dounce 匀浆器（每次分别匀浆不同的组织）。加入约 2.5ml 冰上冷却的 PBS，冰上研磨 5 次。把上清转移到一预冷的 50ml 圆锥底部，螺旋盖的聚丙烯离心管，尽量把残存的组织碎片留在匀浆器上。加入更多的 PBS 到匀浆器，再重复匀浆 4 次，直到大部分组织被破坏，把上清转移到冷却的 50ml 离心管。
3. 用镊子除去匀浆器上的残存物，并重复第 2 步，把所有的肾或脑匀浆。
4. 往一离心管中加入冰冷的 PBS 至 50ml，并上竖立 2～3min，小心地把上清转移到一新的 50ml 离心管。4℃，208g（如用 Sorvail H1000B 转头，1000r/min）离心。轻轻地倒去上清，不要破坏细胞沉淀。
5. 细胞沉淀中加入约 1ml 冰冷的 PBS，轻轻地吹打细胞使之重悬，用微量移液器除去不能悬浮的残存物。加冰冷的 PBS 至 50ml，轻轻地混匀，重复离心（第 4 步）。除去上清，在冰上用残存的 PBS 重悬细胞。
6. 加入 1ml 冰冷的 PBS 并转移到一 15ml 圆锥底、螺旋盖的聚丙烯离心管。在 1.5ml

离心管中准备 20μl 20 倍稀释的细胞悬液，用细胞计数其计量细胞总数。

7. 假设计数的细胞中有 40%是 RBC（没有染色体 DNA），减去估计的 RBC 数，然后用冰冷的 PBS 把含 DNA 的细胞的浓度调到 1×10^8个/ml（一个细胞含 6～10pg DNA）。
8. 把细胞包埋在琼脂糖胶中用于提取高分子质量 DNA（支持方案 2，第 6～10 步）。

支持方案 4　基因组 DNA 的部分酶切以及不同大小的片段的分离

PAC 载体用限制性内切核酸酶 *Bam*H Ⅰ 的酶切位点作为克隆位点。然而，*Bam*H Ⅰ 用于基因组 DNA 的部分酶切并不合适，因为 DNA 中可能存在不含 *Bam*H Ⅰ 的酶切位点的区域。大家更倾向于用识别 4 个碱基的限制酶 *Mbo* Ⅰ。限制酶 *Mbo* Ⅰ 能产生 4 个碱基的黏性末端，并且与载体上 *Bam*H Ⅰ 的酶切产生的黏性末端一致。因为 pBACe3.6 有 *Bam*H 和 *Eco*R Ⅰ 克隆位点，所以可以用 *Mbo* Ⅰ 或 *Eco*R Ⅰ 做部分酶切。使用这个实验方案，可以获得约 300μl 2～20ng/μl 的 DNA 片段。

材料（标√的条目参见附录 1）

0.5mol/L EDTA 溶液中保存的，包埋高分子质量基因组 DNA 的琼脂糖 plug（支持方案 2 和 3）
√0.5×TBE 缓冲液，无菌
95%（*V*/*V*）乙醇
用 0.5×TBE 缓冲液配置的 1%（*m*/*V*）的琼脂糖胶（超纯；life Technologies）
跑琼脂糖电泳用的低范围的 PRG marker，这些 marker 包含 λ*Hin*d Ⅲ 片段和 λ 多联体的混合物
√0.5mol/L EDTA，pH 8.0
√用 0.5×TBE（见配方）溶解的 0.5μg/ml 的 EB
√1×*Mbo* Ⅰ 缓冲液
10U/μl 的限制性内切核酸酶 *Mbo* Ⅰ（Life Technologies）
1mol/L $MgCl_2$
10mg/ml 的蛋白酶 K（Boehringer Mannheim）
√10%（*m*/*V*）*N*-lauroylsarcosine
√TE_{50}缓冲液：10mmol/L Tris · Cl（pH 8.0），50mmol/L EDTA（见试剂的配方）
√100mmol/L PMSF 溶液
10mg/ml 的 BSA（New England Biolabs）
√10×*Eco*R Ⅰ 限制酶/甲基化酶的缓冲液
0.1mol/L 亚精胺
20 U/μl *Eco*R Ⅰ 限制酶（New England Biolabs）
40 U/μl *Eco*R Ⅰ 甲基化酶（New England Biolabs）
√TE 缓冲液，pH 8.0
√1×TAE 缓冲液（选择使用）
λDNA
无菌的 15ml 和 50ml 圆锥底、螺旋盖的聚丙烯离心管

恒定钳压的，单相的电流场设备（CHEF，contour-clamped homogeneous electrical field）（Bio-Rad 或其他公司）及 1.5mm 厚含 20 个孔的梳子

数字成像仪（Alpha Innitech IS1000 或者其他公司）

一次性的、γ 射线灭菌的接种环

透析管，内孔直径 3/4in，MWCO 为 12 000～14 000 Da（Life Technologies 或其他公司）

透析 clip

胶用电用设备［Bio-Rad Sub-cell GT DNA 电泳槽，31cm（长）×6cm（宽），或者其他类似设备］

宽内径移液管头

1. 取 6 个含 DNA 的琼脂糖 plug 到 50ml 圆锥底、螺旋盖的离心管，离心管中装有 50ml 0.5×TBE 缓冲液。4℃，透析≥3h。
2. 用 95%乙醇清洗 1.5mm 厚的梳子，并用高压灭菌（指示）胶带包住梳齿从而生成能容乃 DNA plug 的大的胶孔。在胶的两边留下足够的用于 PFG marker 的胶孔，在 marker 和预备的胶孔中间至少留一个孔 。
3. 把预备好的梳子沿着短轴放在 CHEF 模型上，准备 1% 的琼脂糖以制备足够厚度的琼脂糖胶，胶的厚度要足以容纳含样本 DNA 的琼脂糖 plug。胶凝固，加 2L 0.5×TBE 到 CHEF 设备容器中，并放在 14℃。小心地移去梳子并把 plug 加到大的胶孔中。在预备的大的胶孔两侧的泳道中加入一低范围的 PFG marker。不要用 1% 的琼脂封胶孔。
4. 把胶放入预冷的电泳仪，14℃，4V/cm 沿着长轴电泳 10h，脉冲时间为 5s。从胶孔中取出 plug，4℃保存在 50ml TE 缓冲液中（保存 2 个星期），或者 4℃保存在 0.5mol/L EDTA（pH 8.0）溶液中（可保存一年）。
5. 用 0.5μg/ml 的 EB 染胶，并用数字成像仪检测切断的 DNA（染色体 DNA 不能从 plug 中跑出来）。

用限制酶 *Mbo* Ⅰ 酶切

6a. 把电泳后的 DNA plug 转移到 50ml 1×*Mbo* Ⅰ缓冲液，4℃透析过夜。

7a. 把一个 DNA plug 切成 4 片，并用一次性的、γ 射线灭菌的接种环把它们分别加入到 4 个微量离心管中。每管中加入 400μl 1×*Mbo* Ⅰ缓冲液和 2.5 个单位的 *Mbo* Ⅰ。冰上放置 1h。

8a. 每管中加入 5μl 1mol/L $MgCl_2$，冰上放置 15min 后，37℃孵育 20～40min。使用不同的孵育时间和不同量的酶测出部分酶切效率最高的条件。

9a. 迅速把离心管放在冰上，加入 150μl 0.5mol/L EDTA、30μl 10mg/ml 蛋白酶 K 及 75μl 10% *N*-lauroylsarcosine，混合均匀，37℃孵育 1h。

10a. 把溶液和 plug 倒入培养皿，用微量移液器吸取溶液。用 TE 缓冲液冲洗 plug。用一次性的、γ 射线灭菌的接种环把 plug 转移到圆锥底、螺旋盖的 15ml 离心管。

11a. 加入 15ml TE_{50} 和 15μl 100mmol/L PMSF 缓冲液，4℃透析 20min，透析 3 次。4℃，用 TE_{50} 缓冲液透析 2 次，每次 30min。进行第 12 步。

用 *Eco*RⅠ和 *Eco*RⅠ甲基化酶进行酶切

6b. 用一次性的、γ射线灭菌的接种环把预电泳后的 DNA plug 转移到不同的微离心管。

7b. 加入 25μl 10mg/ml 的 BSA、50μl 10×*Eco*RⅠ限制酶/甲基化酶的缓冲液及 13μl 0.1mol/L 亚精胺。混合均匀。

8b. 通过改变加入的 *Eco*RⅠ限制酶（1～2U）和 *Eco*RⅠ甲基化酶（0～200U）的量检测出部分酶切的最优条件。加无菌水至 500μl，并把离心管至于冰上 1h，让酶进入 plug。

9b. 37℃孵育 2.5h，然后置于冰上。

10b. 加入 150μl 0.5mol/L EDTA、30μl 10mg/ml 蛋白酶 K 及 75μl 10% *N*-lauroylsarcosine。混合均匀，37℃孵育 1h。

11b. 按第 10a 和 11a 步所描述的方法清洗 plug，然后进行第 12 步。

12. 用 CHEF 设备确定部分酶切的最佳条件。用与基本操作手册中第 13 步一样的条件。

13. 取两个新的 plug，每个被切成 4 片，在部分酶切的最佳条件下进行完全一样的 8 个部分酶切。把 plug 保存在 4℃ TE_{50} 缓冲液中备用（可以保存一个月）。

14. 用 95%乙醇清洗一 1.5mm 厚、20 个孔的梳子，并用高压灭菌（指示）胶带把梳子中央的 4～6 个梳齿包起来形成足够大的梳子以备用。往一小的 CHEF 胶槽中倒入 1%琼脂糖，琼脂糖胶的厚度能覆盖加在样孔中的样本胶块。让胶在常温下凝固 1h。胶凝固后，往 CHEF 槽中倒入 2L 0.5×TBE，并在 14℃使设备保持平衡。

15. 轻轻地拔去梳子，并把部分酶切产物（8 片小的胶）加到大的点样孔中。在两旁的点样孔中加入低范围的 PFG marker，并往点样孔中加入 1%熔解的琼脂糖胶以填补空隙。

16. 如图 5.4.2 所示，通过连续 3 次凝胶电泳，其中只一次改变电流方向，能把 DNA 按分子质量大小分开。在第一步，调整胶的方向，从而使 DNA 在电场中从胶孔往离胶孔最近的胶的边缘迁移。0.5×TBE 缓冲液中，14℃，电泳 6h，电压为 5.0V/cm，脉冲时间为 15s，120°角。如果有必要的话，在 4.5～5.0V/cm 选择最优电压以使<120kb 的片段跑出胶。

17. 更换电泳缓冲液，胶在电泳槽旋转 180°，用同样的电泳条件进行第二次电泳，使所有保留在胶上的片段回到原来的胶孔。

18. 往胶两旁没使用过的胶孔中加入新的标记 DNA。在第三步，在 6V/cm，0.1～40s 的脉冲条件下，电泳 16h 能分离高分子质量的片段。

19. 切下外侧含有 marker 和跑样品的泳道两侧 1～2mm 的胶用以确认部分酶切成功。用塑料薄膜包起剩余的跑样品泳道的胶，并保存在 4℃。

20. 对胶外侧切下的部分进行 EB 染色，并用数字成像仪上的荧光标尺确定分子质量大小的范围。

    被染色的那部分样品泳道的胶应该包含 120kb～1Mb 这样一个大范围的染色带。

21. 每间隔 0.5cm 水平切下跑基因组 DNA 泳道的胶以获得 150～500kb 范围内的含不同大小 DNA 片段的胶块。从每一个 size-fraction 块中切下约 1mm 宽的胶片并且把 size-fraction DNA 块保存于 4℃，0.5mol/L EDTA 中备用。

    如果 DNA 几天内要被稀释，也许可以把胶块保存到灭菌的 0.5×TBE 中，4℃

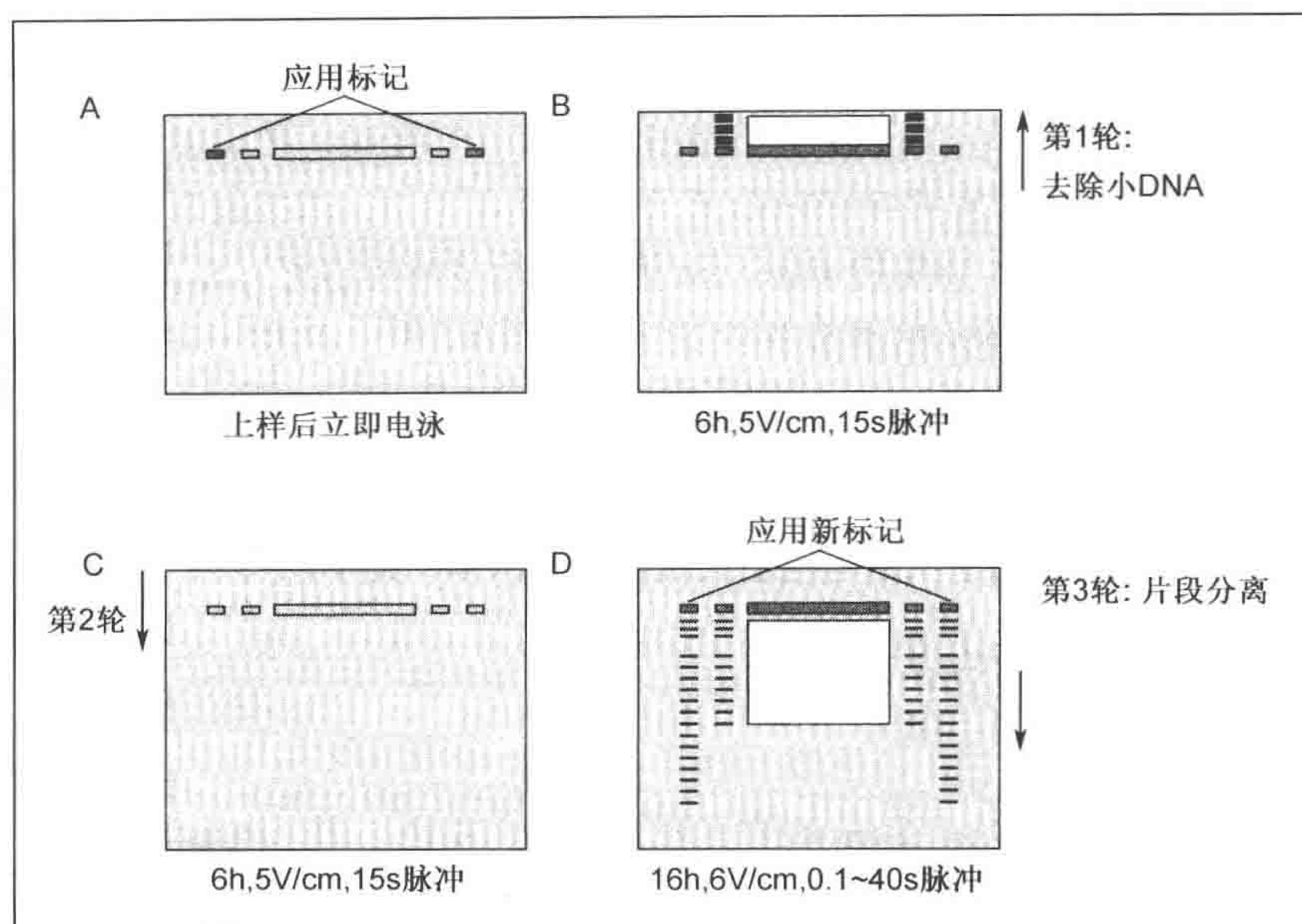


图 5.4.2　PFGE 分离琼脂糖胶块中的 DNA。A. 含有 DNA 部分降解产物的琼脂糖块加到 1%琼脂糖胶中央的样孔中，低范围的 PFG marker 加到两边的样孔中。DNA 的分离要经过 3 次 CHEF 步骤，所有步骤中脉冲呈 120°角。B. 起始的电压方向使 DNA 从点样孔迁移到最近的胶的边缘（距离胶孔右 1cm）。<120kb 的片段跑出胶。C. 转换胶的方向，然后在同样的条件下使胶上的所有片段回到原来开始的胶孔。D. 跑完第二次后，往胶两边没使用的孔中加入新的 DNA marker。跑第三次时，高分子质量片段能分辨出来。这步骤完成后（没有显示），把两边的跑 marker 的泳道从胶上切下并进行 EB 染色以显示不同大小的片段的位置。与第二次加入的 marker 不同，第一次加入的 marker 用来检测第一次电泳的条件；第二次加进的 marker 用来确认电泳完后不同分子质量片段的位置。每间隔 0.5cm 水平切下跑全基因 DNA 泳道的胶，从而获得 150～500kb 范围内的胶。

放置并且可以不进行第 24 步的透析。

22. 把 1mm 宽的胶直接加到 1%琼脂糖胶分开的胶孔中，在 0.5×TBE 进行凝胶电泳。CHEF 仪器上设置的电泳条件为：120°角，6V/cm，16h，脉冲时间为 0.1～40s，14℃。
23. 对剩余的胶用 0.5μg/ml 溴化乙锭溶液进行染色，在数字化成像仪把它们重新组装在一起，并同荧光标尺一起拍照，以确定片段化和酶切位点。
24. 对第 22 步的分析胶用 0.5μg/ml 溴化乙锭溶液进行染色，并且在成像仪上进行拍照，用以评价每个胶块中 DNA 片段的质量和分子大小的分步。选择一两个 150～200kb 范围内的 size-fraction 胶块，并在 15ml 灭菌的 0.5×TBE 中透析 3h。
25. 切下 10cm 长的透析管（每个层析胶块一根透析管）并用无菌水冲洗。用可透析 clip 封闭一段并且彻底清除残余的水。
26. 把 fraction block 和 300μl 无菌的 0.5×TBE 加入到透析管中。彻底清除气泡并用 clip 封住管的另一端。胶长轴的方向与管平行。
27. 在 submarine 胶电泳槽中准备 0.5×TBE，把袋子浸入到浅层的 0.5×TBE。在 clip

上加一个塑料盖，并使盖子向下（其余的透析袋可以同时进行电洗脱）。3V/cm（对于 Sub-Cell GT DNA Electrophoresis Cell 电压为 100V）的电流通过透析袋 3h。

28. 调转电流的方向后持续 30s，使透析袋壁上的 DNA 释放。把袋转移到 1L TE 缓冲液中，4℃透析≥2h 彻底清除硼酸盐离子。这些离子会一直连接反应。

29. 打开袋子，并小心用大容量的 pipet tip 把里面的溶液转移到一新的微离心管中。往浓度为 0.7%～1%胶的点样孔中加入 3～5μl DNA，与不同量（1～50ng）的 λDNA 一起进行电泳，电泳液为 0.5×TBE 或 1×TAE。用 λDNA 作标准估计 DNA 的浓度。稀释的 DNA 保存在 4℃可达 10d（不要结冰）。

支持方案 5　改进的碱裂解法从 BAC/PAC 克隆制备少量 DNA

材料（标√的条目参见附录 1）

BAC 或 PAC 克隆

√LB 培养基或含 25μg/ml 卡那霉素（对于 PAC 克隆）和 20μg/ml 氯霉素（对于 BAC 克隆）的肉汤培养基

√重悬液

碱裂解液：0.2mol/L NaOH/1%（*m/V*）SDS（使用前配制）

沉淀液：3mol/L 乙酸钠，pH 5.5（高压灭菌，4℃永久保存）

异丙醇

70%（*V/V*）乙醇

TE 缓冲液，pH8.0

Not Ⅰ 限制性内切核酸酶及缓冲液（New England Biolabs）

牙签，无菌

12～15ml 带 snap 盖的聚丙烯管

镊子，无菌

Orbital 摇床，37℃

1.5ml 微离心管及带旋转盖的 2ml 管

1. 用无菌牙签接种一个 BAC 或 PAC 克隆到 2ml LB 培养基或含 25μg/ml 卡那霉素（对于 PAC 克隆）和 20μg/ml 氯霉素（对于 BAC 克隆）的肉汤培养基，培养基装在带 snap 盖的 12～15ml 聚丙烯管。用无菌镊子取出牙签。37℃，200r/min，Orbital 摇床上培养过夜（≤16h）。

2. 去掉 snap 盖子，1600*g* 离心 5min。丢弃上清液，加入 0.3ml 重悬液重悬（vortex）菌沉淀。加入 0.3ml 碱裂解液，轻轻摇动管子混匀。室温放置约 5min（悬液将从混浊变得清澈）。

3. 边轻轻摇动，边慢慢加入 0.3ml 沉淀液。把管子竖直放在冰上≥5min。4℃，1600*g* 离心 15min，获得白色沉淀，把管子放在冰上。

4. 用微量移液器和一次性 pipet 把悬液转移到含有 0.8ml 异丙醇的 1.2ml 离心管。倒转几次使之混匀。冰上放置≥5min。避免转移白色沉淀。如果需要，悬液可以在 −20℃保存过夜。

5. 室温下用微离心机最大转速离心 15min。尽可能多地吸去悬液。加入 0.5ml 70%乙醇清洗 DNA 沉淀。4℃以最大转速离心 5min。用点样用的 pipet 尽可能多地吸去上清液。室温下风干沉淀直到沉淀透明。
6. 加入 100μl TE 缓冲液，静置溶液使沉淀重悬，或者可以轻轻地拍打管底使溶质混匀（约>1h）。不要用打匀。
7. 取 5～10μl DNA 用于 0.1U *Not* Ⅰ的酶切，或取 18μl 用于含更多酶切位点 *Bam* HⅠ或 *Eco*RⅠ的酶切试验。通过脉冲电场凝胶电泳分析酶切位点之间的片段大小。

参考文献：Albertson *et al.*, 1990；Ioannou *et al.*, 1994；Osoegawa *et al.*, 1998；Shizuya *et al.*, 1992；Sternberg，1990

编　　者：Kazutoyo Osoegawa，Pieter J. de Jong，Eirik Frengen，and Panayiotis A. Ioannou

第 6 章　确定基因组 DNA 候选基因

一系列数据库提供了寻找疾病基因的基本工具。这些数据库包括基因组 DNA 和表达序列，在过去的几年里发展很快。包括蛋白质序列和蛋白质三维结构的数据库发展也很快。这些数据库的说明和资源类型详见单元 6.2。确定疾病基因之前首先要查阅这些数据库。经过查阅数据库，得到一系列的候选基因，有助于确定疾病基因。用第 7 章的方法寻找每个候选基因的信息，寻找致病突变。然而，这种寻找候选基因的方式过程漫长而又令人沮丧，因为找到一个突变的概率就如同在 100 万 bp 的基因组 DNA 中寻找一个单核苷酸的概率一样小。增加在大范围基因组 DNA 内寻找突变的困难，主要是因为候选基因清单尚不完善。还有一种可能是当前人类基因组的版本尚不完善。尽管基因组中的 gap 很小，可有时大到足够包含了部分或整个基因，另一种更严重的问题就是并非所有的基因都包括在基因组中。也就是说，人类 DNA 中注解每个基因，这些注解基因提供了候选基因列表，我们必须意识到这些基因的注解是有错误的并且大多数是需要单独确证的。错误来源于哪里？这些基因怎么被注解的？本章主要谈论确定基因组 DNA 的方法。尽管基因注解已经确定，但在研究中有时会发现使用概述种描述方法会使基因的注解不完全或者不精确。采用本章所描述的方法，我们应该能够鉴别所有编码的基因。

鉴定基因组 DNA 的基因有很多方法。最精确和简单的方法涉及证明编码 cDNA 的 DNA 序列。这样的基因可以通过生物信息学的方法来鉴定，具体见单元 6.1、单元 6.2、单元 6.3。

新的软件包正在被快速加入基因鉴定计划中。单元 6.1 描述了在一个很大的 DNA 序列中鉴定基因会产生的问题，以及目前基因预测中使用的运算法则的优缺点。单元 6.4 介绍了进入人类基因组的综述。单元 6.5 介绍了从 NCBI 数据库中检索信息的方法。

总之，由人类基因组 DNA 片段确定基因是位置克隆过程中最重要的一步。发现基因的致病原理需要基因结构和其编码蛋白质的知识才能完成。

编　　者：J. G. Seidman and Christine Seidman.

单元 6.1　基因鉴定：方法和注意事项

随着人类基因组序列草图在 2000 年 6 月完成，和人类基因组测序工作在 2002 年结束，研究者面临着新的挑战：如何处理这些已完成和未完成的数据。这些数据类似于组装过程，首先测出每一个碱基，然后经过一个阶段把这些数据整合为一个序列片段，最终完成为错误率小于 1∶10 000 的完整序列。尽管以前的测序数据达到了顶峰的程度，研究者开始思考这些序列结构是否代表编码区或非编码区。决定的能力和系统测序的错误有很大关联。由于所有数据都是通过这种方式产生的，本质上是“匿名的”，没有人知道所测出

的 DNA 的某一结构就是其编码区。结果，自动分析的方法在注解人类和其他物种基因组方面的作用越来越大，增加了这些提交到公共数据库数据的价值。

鉴于基因鉴定中存在的问题，简单的回顾起生物学功能是很重要的，本质上这是一个数学问题。在 DNA 水平上，真核基因上游的启动子和其他调控元件控制着这基因的转录。这种基因是不连续的，由外显子和内含字组成。DNA 转录成 RNA 后，需要完成在 5′加帽和 3′加尾的修饰。完成内含子的剪接（发生在内含子外显子交界处和内含子处）以后，RNA 分子成熟。剪接和起始密码子和终止密码子确定，成熟的 mRNA 通过核孔转移到胞浆，胞浆是转录发生的场所。

从 DNA 到蛋白质的过程真核生物要比原核生物复杂得多。不幸的是：控制 DNA 到蛋白质的进程的信号尚不确定，阻碍了其应用。例如，70%的启动子上游包含了 TATA 盒，但由于余下的部分并不确定，所以有或没有 TATA 盒并不能确定所在区域是否为启动子区。类似的，在末端修饰过程中，polyA 尾有或者没有，或者不包含规则的 AATA-AA 。更复杂的是，可读框对于确定基因的外显子是必需的，但却不是完全的。考虑到上述问题和其他方面，没有一种直接的方法可以 100%确定基因的外显子和内含子。尽管如此，依赖一系列方法整合起来的方式，可以增加基因结构预测的可信性。

简单地说，寻找基因的策略可以归为三种主要类型。Content-based 方法依赖于所有序列的特性。出发点包括特定密码子使用的频率、重复周期和序列的组成复合性。由于不同的生物以不同的频率使用同义密码子，这些基因簇可以帮助鉴定更像外显子的区域。相反，Site-based 方法，主要集中研究特殊序列、类型和一致性的出现或者缺乏。这些方法用来检测诸如供体和受体剪接点、转录因子结合点、polyA、起始密码子和终止密码子等的特点。Comparative 法，基于序列同源性。为了检测编码区是否和相应的参比序列一致，转录后的序列和蛋白质序列提交到数据库（如 BLASTX；单元 6.3）。上述最直接的三种方法是理论上的，它们还有其局限处：新发现的基因不能找到与基因产物相匹配的蛋白质数据库。蛋白质的模拟性和仅有部分蛋白质序列这一事实使其很难预测除外显子区域外的序列的功能。读者可以阅读一些关于上述方法的很经典的综述（Claverie，1997a，b，1998；Guigo，1997；Snyder and Stormo，1997；Rogic et al.，2001）。很多预测基因的方法严格说都属于上述三种方法，为了优化预测能力，这里将会讨论不同方法的结合。

考虑到问题的复杂性和方法的局限性，研究者应该知道每种方法应用的时间和方式。依照数据库的特点本章会详细介绍每种方法的应用。换句话说，一种方法可以更好地应用于人类已完成的序列，另一种方法可能更适于未完成的序列或其他物种的序列。

基因确定方法

GRAIL

GRAIL——基因识别和网络链接分析（http://compbio. ornl. gov/tools/inder/sht-ml），这种方法是运用时间很长的一种基因预测技术，是最早被使用并且被广泛应用的技术。随着对基因的一般结构越来越多的了解和很多好的网络工具被广泛应用，为了紧跟目前这一领域发展状态 GRAIL 技术在不断演变。

现讨论 GRAIL 的两种方法。GRAIL 1：应用一个神经网络方法在一个固定的长度（100 个碱基）识别可能的编码区，windows 考虑序列本身，而不寻找其他的特征，如剪切位点、起始子或终止子。GRAIL 1 延伸的一种方法称为 GRAIL 1a，就是考虑区域邻近一定有有编码潜力的区域，这在寻找真正的外显子和减少假阳性方面都有很好的表现。无论 GRAIL 1 还是 GRAIL 1a 都适合于寻找单个的外显子。进一步细化产生了第二种方法，称为 GRAIL 2，在这种方法中可变的字节长度和上下序列信息（如剪切位点、起始子和终止子、polyA 信号）都被考虑在内，因此 GRAIL 2 是在预测时将整个的基因组内容都考虑在内，适合于确定模型基因结构。

举例，将输入数据用同样的设定在两种方法下得到的结果来强调方法的优点和缺点，被考虑的序列是人类的 BAC 克隆：7q31 的 RG364P16，这一片段被认为是 7 号染色体的系统化序列（GenBank AC002467）。为了达到例子的目的，应用了一种称为 XGRAIL 的客户机-服务器应用方法，这个软件在 UNIX 平台下运行，允许 GRAIL 1/1a/2 结果以图形方式输出，如图 6.1.1 所示。因为在咨询的 DNA 序列很大并且可能包含至少一个基因，选择 GRAIL 2 这一方法。上面大的窗口展示 98kb 组成这一序列的概况，用户可以选择性的打开或关闭任一决定这段区域的特征标记（描述在图像注释中）。这一示图最重要的是在窗口顶部所预测的外显子，所有这些预测的外显子的信息展示在 Model Exons 窗口，这些模式外显子能够被汇编和展示作为 Model Genes 和作为 Protein Translation。只有带有可接受概率值（GRAIL 算法确定）的假定外显子包含基因

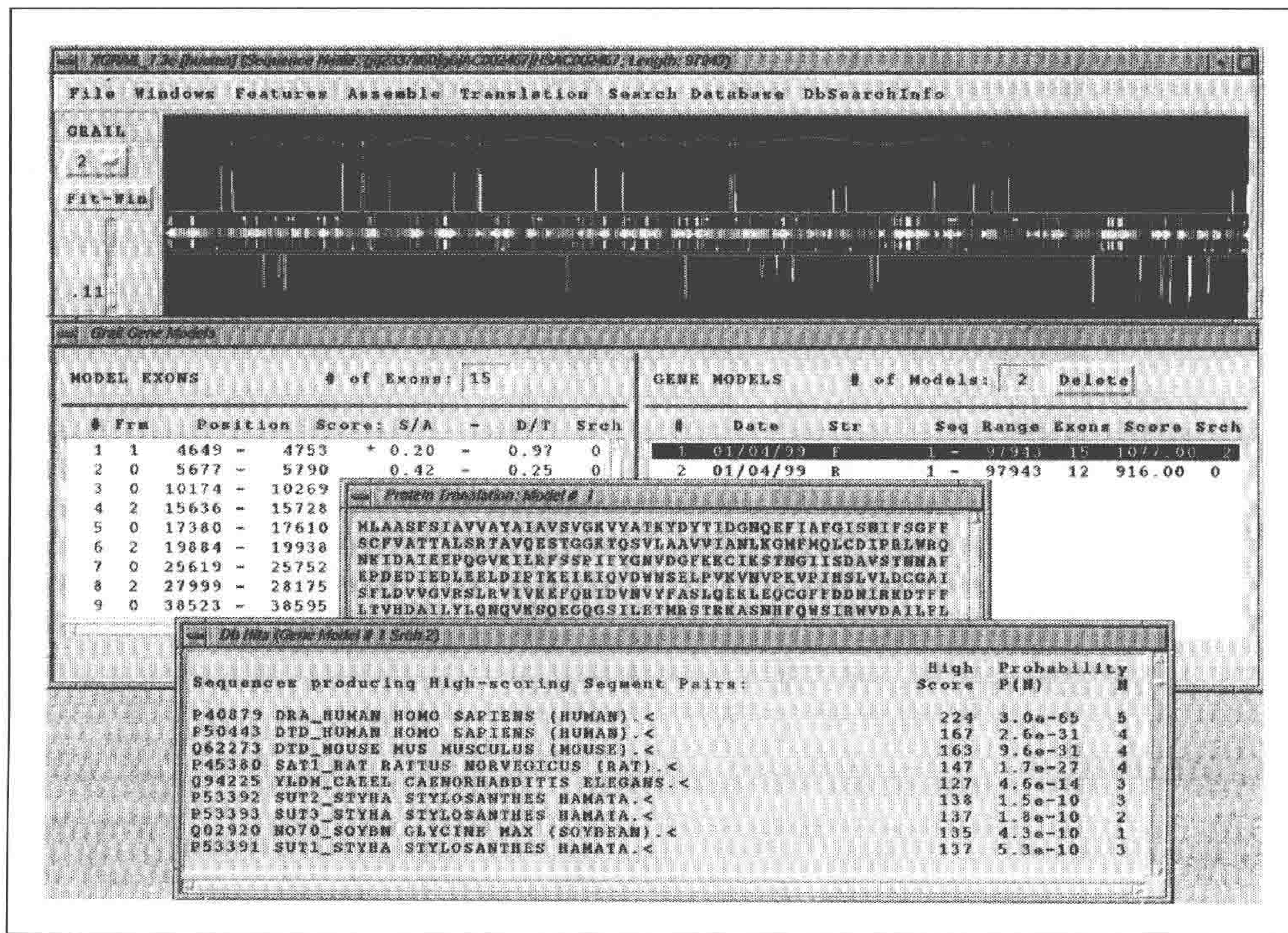


图 6.1.1　目前，GRAIL 的作者发布了 GRAIL-EXP（http://grail . lsd/ornl. gov/grailexp/），这一方法基于 GRAIL 但应用附加的信息进行预测，包括已知完整的或部分的基因讯息数据查询。在决定基因模型中这个数据查询的列入大大改进了最初的 GRAIL 算法。

模型。同样蛋白质翻译可以在公共数据库中进行搜索，用一个称为 genQuest 的程序（已被整合入 XGRAIL）找到同源序列，这些都显示在 Db Hits 窗口。在这个例子中，第一个基因模型的第 15 个外显子（来自 forward stand）被翻译成蛋白质，并且与硫酸盐转移有关的一组蛋白质表现重要的序列同源性。

FGENEH/FGENES

FGENEH，是由 Victor Solovyev 和同事开发的一种通过寻找结构特征（如供体受体剪接位点、潜在的编码区、推测的外显子的内含子区的 5′端和 3′端）以预测内部外显子的方法。这个方法使用线性判别分析（使来自多个实验的数据结合在一起的一种数学技术）。一旦数据相结合，线性功能就用于判别事件的两种可能——这里就是指 DNA 的给定扩展是或不是一个外显子。在 FGENEH 中，线性判别方法的结果后来转变成自动程序化的算法，决定了如何将这些预测的外显子最好地整合成一个基因模型。FGENEH 的一种延伸叫做 FGENES，能够使用于 DNA 的给定扩展预测多个基因。

Sanger 中心网络服务器提供一种十分简单的前端执行 FGENES 搜索。查询序列（再次，这个讨论中来自 7q31 的 BAC 克隆）粘贴在查询框中，点确认键，搜索就开始执行。结果以图表格式输出，见图 6.1.2。预测基因和外显子的总数（分别为 2 和 33）显示在输出结果的顶端。随后是每个基因（G）的详细信息。对每一个预测的外显子，给出了链（Str），＋表示正向链，－表示反向链。在这个特例中特征列表包括开始外显子（CDSf）、内部外显子（CDSi）、终止外显子（CDSl）和多聚 A 区（PolyA）。核苷酸区域给出了一个预测范围。在这个例子中，第二个预测基因的特征以相反顺序给出，因为预测基于反向链。表格中基于这些信息的预测蛋白在底部以 FASTA 格式输出。预测蛋白的定义行给出了核酸残基的范围，包括蛋白质的整个长度和预测基因的方向（＋和－）。

MZEF

MZEF 即“Michael Zhang's Exon Finder”的缩写，以其在冷泉港实验室的开发者命名。预测是基于一种叫做判别分析（Zhang，1997）的技术。假设一种情况：两种类型的预测结果，分布是相对简单的 x-y 图（如剪接位点的分值相对于外显子的长度）。如果这两种数据之间的关系是非线性或多元的，结果图看起来就像一些成群的点。这些成群的点中有一部分点代表一个“正确的”预测，所以判别功能用来区分正确的预测点和不正确的预测点（此技术故名）。就 MZEF 来说，测量的变量包括外显子的长度、内含子-外显子和外显子-内含子的过渡、分支位点、3′和 5′剪接位点和外显子、链和结构分值。MZEF 能预测内部的编码外显子，而不提供基因结构的其他任何信息。

目前，MZEF 有两种执行工具提供。程序能够从 CSHL FTP 下载在 UNIX 系统下运行，或者通过网页前端执行。输入的是一个单纯的序列，读时朝一个方向（正向或者反向链）；对两种链进行 MZEF 分析，程序要运行两次。返回到 7 号染色体 BAC 克隆的例子，MZEF 预测了正向链包含 27 个外显子（图 6.1.3）。表格的头两栏：预测的区域给出了一个范围，接下来是预测正确（P）的可能性。$P>0.5$ 的预测认为是正确的而且包括在表格中。不同方法预测的不同之处显而易见。MZEF 再次用于寻找单个的外

```
Number of predicted genes:   2 In +chain:   1 In -chain:   1
Number of predicted exons:  33 In +chain:  23 In -chain:  10
Positions of predicted genes and exons:
 G Str Feature  Start       End    Weight   ORF-start ORF-end

 1 +    1 CDSf    3413 -    3594    2.50     3413 -    3592
 1 +    2 CDSi    4606 -    4753    1.73     4607 -    4753
 1 +    3 CDSi    5677 -    5790    1.91     5677 -    5790
 1 +    4 CDSi    9956 -   10033    2.55     9956 -   10033
 1 +    5 CDSi   10174 -   10269    1.86    10174 -   10269
 1 +    6 CDSi   11486 -   11592    1.81    11486 -   11590
 1 +    7 CDSi   13595 -   13664    3.39    13596 -   13664
 1 +    8 CDSi   15636 -   15728    2.38    15636 -   15728
 1 +    9 CDSi   17380 -   17610    1.97    17380 -   17610
 1 +   10 CDSi   19884 -   19938    2.72    19884 -   19937
 1 +   11 CDSi   25607 -   25752    3.18    25609 -   25752
 1 +   12 CDSi   28092 -   28175    3.04    28092 -   28175
 1 +   13 CDSi   40915 -   40981    1.00    40915 -   40980
 1 +   14 CDSi   41081 -   41262    1.42    41083 -   41262
 1 +   15 CDSi   51053 -   51131    1.31    51053 -   51130
 1 +   16 CDSi   55392 -   55442    0.95    55394 -   55441
 1 +   17 CDSi   60609 -   60692    1.52    60611 -   60691
 1 +   18 CDSi   64433 -   64600    3.71    64435 -   64599
 1 +   19 CDSi   68964 -   69064    3.15    68966 -   69064
 1 +   20 CDSi   69448 -   69531    3.48    69448 -   69531
 1 +   21 CDSi   70971 -   71044    3.04    70971 -   71042
 1 +   22 CDSi   73696 -   74083    2.25    73697 -   74083
 1 +   23 CDSl   74150 -   74731    2.94    74150 -   74728
 1 +      PolA   75218              4.18

 2 -      PolA   82006              4.57
 2 -    1 CDSl   82727 -   82738    1.32    82730 -   82738
 2 -    2 CDSi   83132 -   83197    2.58    83132 -   83197
 2 -    3 CDSi   83319 -   83461    2.79    83319 -   83459
 2 -    4 CDSi   87607 -   87661    3.62    87608 -   87661
 2 -    5 CDSi   89473 -   89706    2.93    89473 -   89706
 2 -    6 CDSi   90330 -   90425    1.75    90330 -   90425
 2 -    7 CDSi   92005 -   92097    1.79    92005 -   92097
 2 -    8 CDSi   92190 -   92259    1.39    92190 -   92258
 2 -    9 CDSi   93728 -   93834    2.05    93730 -   93834
 2 -   10 CDSi   95221 -   95316    2.27    95221 -   95316

Predicted proteins:
>FGENES 1.5 AC002467        1 Multiexon gene     3413 -    74731     1087 a Ch+
MLSRPTVGSGFPTSCLSTDGVHSTVSLWGRMGYKEKRSLKINLTGRESKATRAENQTDLV
RFLPPELPPVSLFSEMLAASFSIAVVAYAIAVSVGKVYATKYDYTIDGNQEFIAFGISNI
FSGFFSCFVATTALSRTAVQESTGGKTQVAGIISAAIVMIAILALGKLLEPLQKSVLAAV
<remainder of output truncated>
```

图 6.1.2　FGENES 用人 7q31 的 BAC 克隆 RG364P16 作为查询项得到的输出结果。从左至右各栏分别代表基因数（G）、链（Str）、特征（在文中描述）、预测外显子的开始和终止处、分值权重、可读框的开始和终止处（ORF-start 和 ORF-end）。每个预测的基因以分开的板块显示。接下来的是每个预测基因的蛋白质翻译产物。

显子，因此在预测基因中外显子没有显示出来，它们在 GRAIL 和 FGENES 有提到。再者，这些方法进行的外显子预测结果不相同，这在以后的内容中会讨论到。

GENESCAN

GENESCAN，由 Chris Burge 和 Sam Karlin 开发，用于预测完整的基因结构。与其他的一些基因鉴定算法一样，GENESCAN 能够鉴定内含子、外显子、启动子位点和 polyA 信号。与 FGENES 一样，GENESCAN 不是假定输出序列代表一个和仅一个基因，或者一个和仅一个外显子，它能够准确地预测序列，这些序列代表基因间 DNA 区分的部分基因或者多个基因。当一个序列内容多变时，准确预测的能力使 GENESCAN 对基因鉴别具有其独特的作用。

Internal coding exons predicted by MZEF
Sequence_length: 97943 G+C_content: 0.391

Coordinates	P	Fr1	Fr2	Fr3	Orf	3ss	Cds	5ss
4606-4753	0.548	0.475	0.614	0.444	212	0.531	0.547	0.538
5469-5543	0.557	0.588	0.461	0.600	121	0.499	0.594	0.622
7353-7630	0.826	0.584	0.520	0.549	122	0.498	0.585	0.632
10174-10269	0.546	0.605	0.443	0.442	122	0.517	0.552	0.515
13595-13664	0.998	0.552	0.463	0.608	121	0.564	0.570	0.736
15636-15728	0.534	0.444	0.432	0.544	221	0.488	0.500	0.636
16654-16749	0.904	0.541	0.398	0.458	122	0.534	0.531	0.615
17380-17610	0.940	0.614	0.470	0.442	122	0.518	0.569	0.594
18736-18797	0.597	0.417	0.550	0.603	221	0.536	0.618	0.619
19884-19938	0.866	0.434	0.406	0.537	221	0.550	0.504	0.657
24126-24225	0.969	0.655	0.543	0.539	122	0.532	0.622	0.559
25607-25752	0.977	0.551	0.452	0.466	122	0.530	0.542	0.647
28107-28175	0.966	0.438	0.412	0.662	221	0.492	0.579	0.562
37600-37687	0.605	0.328	0.610	0.434	212	0.515	0.549	0.586
38297-38434	0.946	0.558	0.511	0.441	122	0.528	0.540	0.559
50415-50823	0.632	0.557	0.451	0.470	122	0.543	0.533	0.519
55133-55173	0.873	0.375	0.489	0.530	221	0.531	0.524	0.702
57112-57175	0.518	0.562	0.424	0.469	122	0.514	0.530	0.618
61089-61182	0.602	0.438	0.552	0.456	212	0.556	0.549	0.700
64433-64600	0.980	0.614	0.552	0.505	122	0.517	0.599	0.606
68964-69064	0.941	0.316	0.579	0.564	211	0.513	0.534	0.558
69448-69531	0.997	0.565	0.444	0.364	122	0.536	0.523	0.705
70971-71044	0.948	0.448	0.300	0.507	121	0.575	0.462	0.656
73696-74083	0.968	0.487	0.594	0.498	212	0.552	0.574	0.536
77911-77972	0.596	0.467	0.593	0.434	212	0.480	0.549	0.602
80338-80413	0.944	0.467	0.464	0.590	221	0.507	0.555	0.662
97197-97358	0.738	0.597	0.497	0.523	122	0.521	0.586	0.545

图 6.1.3　MZEF 用人 7q31 的 BAC 克隆 RG364P16 作为查询项得到的输出结果。从左至右各栏分别给出了预测包含碱基范围的位置（Coordinates），*P* 值（*P*），结构参考分值（Fr_i），ORF 显示可读框，3′剪接位点、编码区和 5′剪接位点的分值。

GENESCAN 是基于作者称呼基因组序列组成和基因结构的一种概率模型。通过寻找与查询序列相配或一致的基因结构描述，此算法能够分配机会概率：给定的延伸序列表示一个外显子、启动子等。有最大可能性的外显子和查询后最有机会成为的外显子的是“最佳外显子”。此方法还能预测“次佳外显子”，序列的延伸有可以接受但是不如最佳外显子好的概率值。GENESCAN 的开发者鼓励用户为了不丢失可选的基因剪接区和其他的非标准的基因结构而检测所有的预测项。

再次用人 7 号染色体 BAC 克隆为例，查询可以直接从 GENESCAN 网页中开始，生物体为 *Vertebrate*，去掉错误的次佳，打印选项选择 *Predicted Peptides Only*。查询结果见图 6.1.4。输出显示在这个区域有 3 个基因，第一个基因有 11 个外显子，第二个有 13 个，第三个有 10 个。表格中最重要的两栏是 Type 栏和 P 栏。Type 栏表示预测是否是一个开始外显子（Init）、一个内部外显子（Intr）、一个终止外显子（Term）、一个单外显子基因（Sngl）、一个启动子区（Prom）或者一个 polyA 信号（PlyA）。*P* 栏给出预测正确的概率。GENESCAN 外显子有非常高的概率值（$P>0.99$），其预测真正的外显子的正确率达 97.7%。这种高概率的预测能用于合理设计用于 cDNA 扩增

```
Gn.Ex Type S .Begin ...End .Len Fr Ph I/Ac Do/T CodRg P.... Tscr..
----- ---- - ------ ------ ---- -- -- ---- ---- ----- ----- ------

1.01 Init +   4697   4801  105  1  0   64   80   103 0.651   7.58
1.02 Intr +   5725   5838  114  0  0   48   91   116 0.993   7.62
1.03 Intr +  10004  10081   78  1  0   61   70    78 0.809   2.13
1.04 Intr +  10222  10317   96  0  0   94   87   117 0.999  11.49
1.05 Intr +  11534  11640  107  1  2  118   62    31 0.953   1.59
1.06 Intr +  13643  13712   70  2  1   88  111    32 0.950   3.77
1.07 Intr +  15684  15776   93  2  0   45   98    59 0.782   1.84
1.08 Intr +  16702  16797   96  0  0   70  100    26 0.709   1.29
1.09 Intr +  17428  17658  231  0  0   69   79   233 0.911  17.55
1.10 Intr +  19932  19986   55  2  1   90   94    29 0.805   1.33
1.11 Term +  25128  25375  248  1  2   48   48   167 0.867   3.67
1.12 PlyA +  25382  25387    6                                1.05

2.00 Prom +  26739  26778   40                               -7.05
2.01 Init +  27929  28093  165  1  0   77   94    65 0.948   5.68
2.02 Intr +  28140  28223   84  2  0   69   64   142 0.901   9.00
2.03 Intr +  29931  30071  141  2  0  126   38    55 0.262   3.93
2.04 Intr +  52002  52164  163  2  1   99   17   149 0.194   7.53
2.05 Intr +  53036  53243  208  0  1   48   -2   191 0.028   3.31
2.06 Intr +  58789  58968  180  1  0   82   35   127 0.411   4.86
2.07 Intr +  59932  60222  291  1  0   69   20   255 0.369  12.13
2.08 Intr +  63258  63277   20  0  2  102   86   -16 0.527  -5.06
2.09 Intr +  64481  64648  168  0  0   47   86   162 0.939  10.90
2.10 Intr +  69012  69112  101  1  2   56   75   115 0.967   5.91
2.11 Intr +  69496  69579   84  0  0   25  115    57 0.615   1.20
2.12 Intr +  71019  71092   74  2  2  105   90   -21 0.950  -2.91
2.13 Term +  73744  74779 1036  1  1   85   44   805 0.960  66.40
2.14 PlyA +  75266  75271    6                                1.05

3.11 PlyA -  75947  75942    6                                1.05
3.10 Term -  83049  82945  105  0  0   77   38    68 0.831  -1.87
3.09 Intr -  83245  83180   66  1  0  113   94    43 0.948   5.58
3.08 Intr -  83509  83367  143  2  2  108   69    88 0.995   8.05
3.07 Intr -  87709  87655   55  1  1   50  115    63 0.988   2.83
3.06 Intr -  89754  89539  216  0  0  110   42   182 0.727  13.58
3.05 Intr -  90488  90378  111  2  0   25  100   169 0.499  11.46
3.04 Intr -  92145  92053   93  0  0  109   59    52 0.893   3.64
3.03 Intr -  92307  92238   70  2  1  101   67    38 0.955   1.27
3.02 Intr -  93882  93776  107  0  2   70   68    84 0.640   2.69
3.01 Intr -  95364  95269   96  0  0   68   75   106 0.661   6.59
Predicted peptide sequence(s):


>AC002467.seq|GENSCAN_predicted_peptide_1|430_aa
MLAASFSIAVVAYAIAVSVGKVYATKYDYTIDGNQEFIAFGISNIFSGFFSCFVATTALS
RTAVQESTGGKTQVAGIISAAIVMIAILALGKLLEPLQKSVLAAVVIANLKGMFMQLCDI
PRLWRQNKIDAVIWVFTCIVSIILGLDLGLLAGLIFGLLTVVLRVQFPSWNGLGSIPSTD
<remainer of output truncated>
```

图 6.1.4　GENESCAN 用人 7q31 的 BAC 克隆 RG364P16 作为查询项得到的输出结果。从左至右各栏分别代表基因和外显子号（Gn. Ex）、预测类型（Type）、预测的链的方向（S，＋表示正向链，－表示反向链）、预测开始和终止点（Begin 和 End）、预测长度（Len）、预测的可读框（Fr）、一些分数栏和概率值。每个预测的基因以分开的板块显示；注意第三个基因的外显子是以反向顺序列出，反映了预测是在反向链的事实。接下来的表格是这三个预测基因的蛋白质翻译产物。

的 PCR 引物或者用于其他目的（当需要极其高的可信度的时候）。GENESCAN 外显子的概率为 0.50～0.99，大部分时候被认为是正确的；最好例子的正确性（P>0.90）大概有 88%。任何预测<0.50 被认为数据不可靠而应去掉，在表中没有列出这些数据。在图 6.1.5 中有选择性的数据被显示了。最佳的和次佳的外显子被显示了，预测的起始和终止外显子的方向被预测并显示了（5′→3′或 3′→5′）。当越来越多的外显子被预测，用表很难去说明时，这种图示对于说明大片段的 DNA 尤其有用。

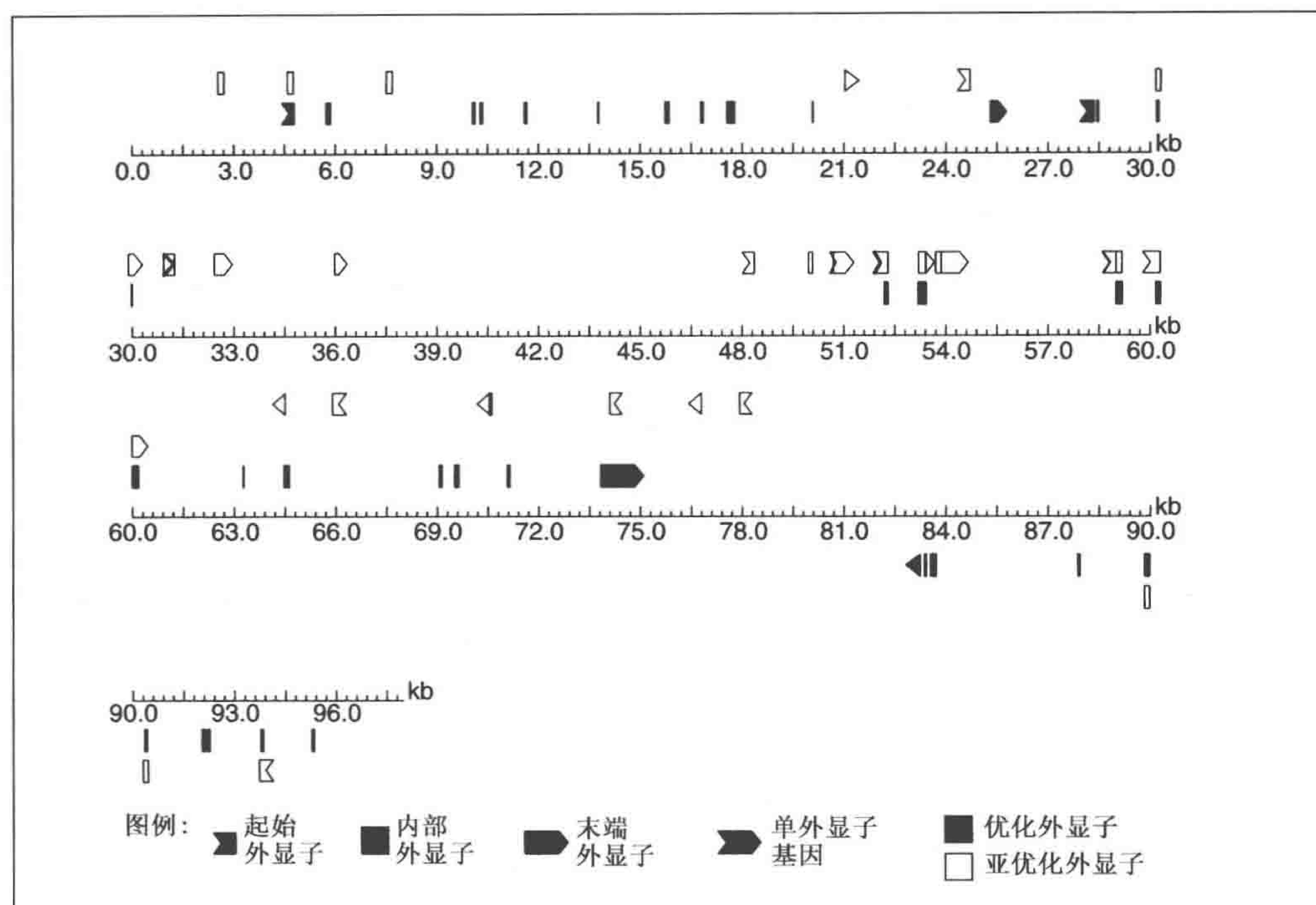


图 6.1.5　使用人 7q31 的 BAC 克隆 RG364p16 查询而获得的 GenomeScan 以图表的形式输出。最佳的和次佳的外显子被提示，预测的起始和终止外显子的方向被预测并显示了（5′→3′或 3′→5′）。

在不久的将来，来自于 MIT 的 Burge 实验室的命名为 GenomeScan 程序将可用。跟比较相似性依据缺乏的外显子相比，GenomeScan 重叠 BLASTX 算法赋予更高的值给公认的外显子。更高相似性的区域（BLASTX E 值）比低相似性的区域有更高的可信度，因为弱的相似性并不代表同源性。因此 GnomeScan 预测倾向于与已检测到的所有或几乎所有高相似性的区域一致。但有时也会忽略包含小的内在信息或与其他的外在信息不一致的弱的相似性区域。在中等或相邻的相关蛋白质序列可利用时，GenomeScan的精确性明显高于 GENESCAN。

PROCRUSTES

按同名原则。PROCRUSTES（http://www-hto.usc.edu/software/procrustes）采用基因组 DNA 序列并使它们与相关的靶蛋白限定的格式相符。不同于被讨论的其他基因预测方法。不基于自身的 DNA 序列算法去找寻内容和位置标记，此算法要求使用者在预测之前确定基因产物，以便于预测展示与公认的转录产物匹配的最合适序列。此方

法采用一种剪切匹配算法有序地搜寻所有可能的外显子排列。如果候选蛋白来源于查询DNA序列，预测正确基因结构的精确度可大于99%。在使用候选蛋白预测的过程中，GenomeScan能充分利用此候选蛋白或相关蛋白的信息，更好地利用公用数据库去决定内含子及外显子在基因中的位置。PROCRUSTES能处理多个基因及基因的部分DNA序列。

PROCRUSTES的查询输入是通过一个Web界面，使用简单。使用者要提供核酸序列和相关的蛋白质序列。PROCRUSTES将对这些蛋白质序列进行相似的处理，因此由DNA序列编码的蛋白质序列不必相同。典型的输出结果包括：所有预测靶蛋白内含子、外显子结构的分布图；概率值；外显子起始和结束核苷酸位置的列表；基因翻译模式（这可能与提交的蛋白质序列不同），并且剪切分布图显示出预测蛋白和靶蛋白的不同。对于限定来源于其他方法获得的结果，PROCRUSTES是一个有用的方法，尤其对于有位置候选背景的结果。

GeneID

当前GeneID的版本（http://www1.imim.es/geneid.html）基于评价编码潜能搜寻外显子。最初的版本最先采用基于规则系统推定外显子和把序列排列到最可能的基因上。GeneID使用位置权重复数评价一个给定的序列的延伸是否出现在剪切位点或起始位点或终止密码子处。一旦进行这个评定，公认的外显子模型被建立起来。基于Gene ID产生的系列预测外显子，最终的限定范围产生了，得到输入序列的最可能的基因结构。

GeneID的界面是通过一个简单的Web前端，使用者把DNA序列粘贴上去，并选择来自于果蝇或是人的组织。使用者可以选择是否只预测正义或反义链，且输出选项包括公认的受体位置、供体位置、起始和终止密码子。使用者可以限定只输出第一个外显子、中间的外显子、最后的外显子或单个基因进行特殊分析。有必要提示，如使用者简单地选择所有外显子将得到所有的相关信息。

GeneParser

GeneParser使用稍微不同的方法鉴定推定的内含子与外显子。不同于事先决定感兴趣的候选区域。GeneParser对提交的序列的子区间进行计算评分。一旦每个子区间被评分了，一个中性的方法被使用去决定每个子区间是否包含第一外显子、中间外显子、最后的外显子或内含子。各预测区间被分析组合而产生最可能的基因。这个程序没有Web前端，但在Sun、DEC和SGI-base systems上可用。

HMMgene

HMMgene以任何给定的DNA序列预测整个基因，其采用HMM方法使精确预测的概率最大。以这种方法使用HMM有助于评定任何一个预测的可信度，HMMgene不仅给出了输入序列最好的预测结果，而且有选择性地预测了序列。此方法的优势在于，反馈回同一区域大量的预测结果，使用者能看到包含一个基因的区域里的可能的选择性剪接。

HMMgene 的前端需要一条输入序列，组织来源选项包括人和线虫。一个有趣的附加选项是使用者使用注释，注释来源于公共数据库或是研究者的个人实验数据。大量序列以 FASTA 格式作为单个任务提交给服务器。在 HMMgene 的网站以文件的形式给出了序列输入格式和结果输出格式。

这些方法处理能力如何?

基于以上所述，不同的方法产生不同的结果，处理一些序列时，一系列公认的外显子产生了，但这些外显子没有基因组背景；而在处理一些序列时，完整的基因结构被预测了，但代价是单个外显子预测的可靠性更小。以确定的 7q31BAC 克隆结果为例，一和三基因之间区域的任何位置被预测了，这些一到三基因的任何位置在 27 和 34 外显子。尽管外显子相似，但外显子的界限并不总是一致。哪种方法在这个特殊的例子里更优越不重要，重要的是结果的偏差。

既然不同的方法表现的好坏取决于检测系统，定量这些算法的表现很重要。许多研究已采用一套变量数据系统检验了这些方法的严格性（Burset and Guigo ，1996；Claverie，1997a；Snyder and Stormo，1997；Rogic *et al.*，2001）。在讨论这些研究结果之前，一些短语的定义被说明了。

对于预测结果，有四种可能的结果：检测到真阳性、真阴性、假阳性或假阴性结果（图 6.1.6)。准确性的两个衡量值能基于这些情况发生的比率来计算：一个是灵敏性，反映了实际编码区域片段被作为编码区域正确地被预测了；一个是特异性，反映了所有预测片段的正确性。最佳方案是，在灵敏性和特异性之间取得平衡的方法，能发现所有的真实外显子但不会产生相应数目的假阳性。一个易懂的度量灵敏性与特异性的值被称为相关系数。正如所有的相关系数，它的值为－1～0 表示预测总是错误的，0～＋1 表示预测总是正确的。

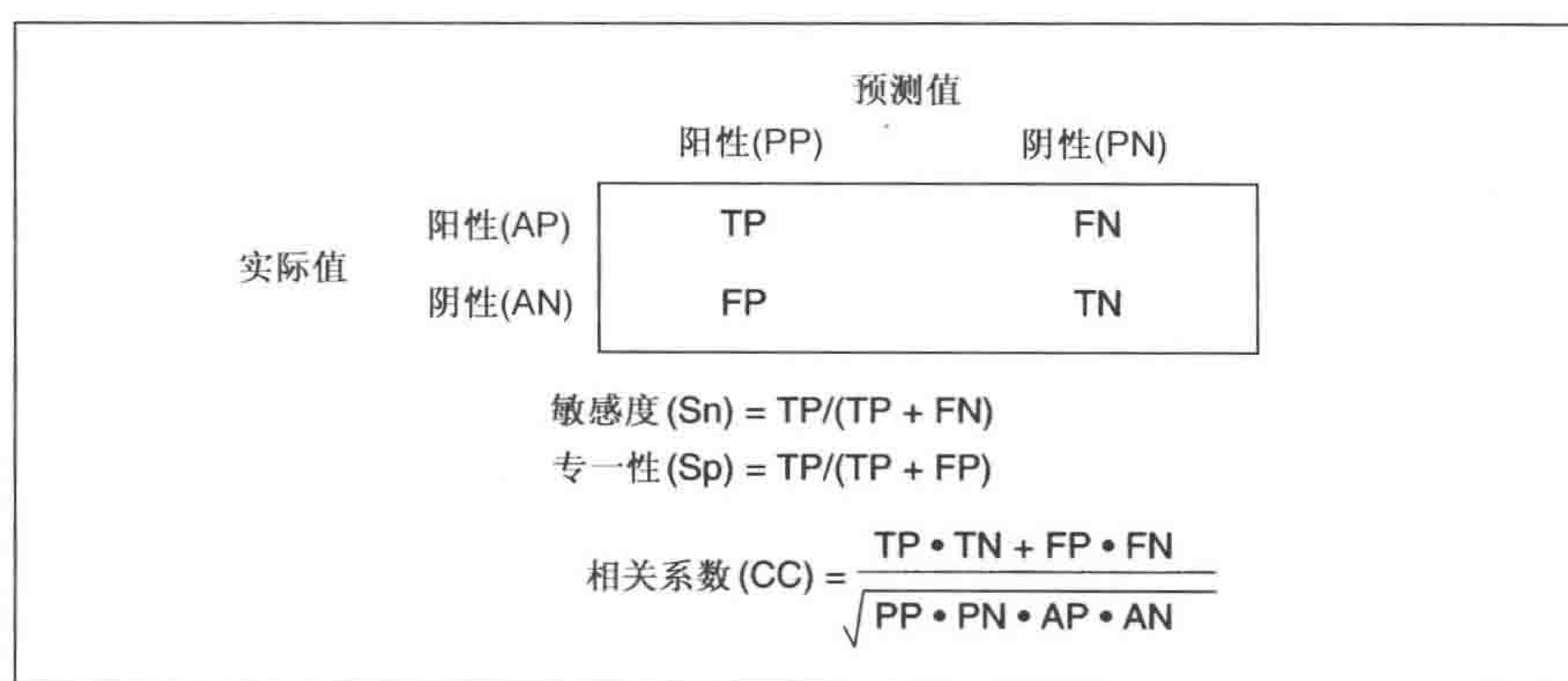


图 6.1.6 此图的矩形框显示了灵敏性和特异性如何从四个可能的输出结果被决定，给出了任何基因预测方法有效性的确定的度量。FN、FP、TN 和 TP 假的和真的阴性和阳性。(图片摘自：Burset and Guigo，1996，and Snyder and Stormo，1997。)

1997 年冷泉港实验室召开的基因预测会议的结果（发现基因计算分析 DNA 序列，1997 年 3 月)，一个叫 Banbury Cross（http//igs-sever. cnrs. fr/igs/banbury）的网站

被建立了。它的建立有两层含义：容许进行程序开发的群体在此发布相关程序以供公众使用，容许研究者积极获取完整特征，完成基于作为标准序列使用的基因组序列的提交。这样，会议参加者建立了基因鉴定领域最新发现发布的论坛。使用这些发布的研究，Jean-Michel Claverie 比较了 14 个不同基因鉴定程序的灵敏性和特异性（Claverie，1997a），包括除了 PROCRUSTES 所有在此被讨论的基因鉴定程序。PROCRUSTES 没被考虑，因为它与其他的基因预测程序具有本质上的不同。检测这些不同来源的数据，要么在独立的研究中发现最好的表现，要么这些方法的研究者在使用这些方法进行比较时发现了最差的表现。基于这些比较，最好的所有单个外显子的搜寻程序是 MZEF，最好的基因结构预测程序是 GENSCAN（最好用 laverie 的文章中得到的数据进行回算，用 CC_{MZEF} 0.79 和 $CC_{GENSCAN}$ 0.86 两种方法分别给出了它们这组中相关系数的最高值）。

因为基因查找程序经历了持续的发展，增加了新的特征，并整合了新的生物信息，大量现有算法比较分析的想法近来被重提了。使用来自于 genebank 195 条序列注释了内含子和外显子界限的独立数据，GENESCAN 和 HMMgene 表现最佳，两者具有 0.91 的相关系数。

思考和对策

从以上提到的这些统计方法，得出 MZEF 和 GENESCAN 尤其适合区分不同阶段的变异序列数据中的内含子和外显子。然而这不应被解释为全部推荐使用这两个程序进行基因的鉴定。记住这些结果呈现了不同来源发现的汇编，记住所得结果可能并不来源于同一数据库。已经无数次地证明了任何程序表现的好或坏都依赖于所输入的序列。已经证明了这些方法的实际表现对 GC 含量高度敏感。纵观所有方法，随 GC 含量的增加，关于一种方法的预测能力提高还是降低的模式没有出现。例如，Snyder and Stormo（1997）报道了 GeneParser（Snyder and Stormo，1993）和 GRAIL2（with assembly）表现最好。

大多数基因定位程序都有一些缺点需要引起用户的注意。因为大多数方法都是用测试数据“训练”的，它们在寻找那些与训练模式相似的基因时可以运行得很好（也就是说，它们对于自己曾经“见过”的相似的东西能够工作得很好）。常用的方法对预测一个基因不连续的开端和结尾有完整的要求，这意味着这些方法可能把一个包含有多个基因或只包含部分基因的区域弄错。为确定一段序列是内含子还是外显子时所设定各个因素的重要性也能影响结果。这些衡量的标准往往有偏见甚至是错误的。最后，还有这样一种基因，它们只转录而不翻译——被称为“未编码 RNA 基因”。

现在越来越能证明没有一个程序能够提供简洁的要点来做计算机基因定位。正确的选择是程序依靠数据的属性和这些数据形成的过程。根据以上研究的描述，我们能够推荐一些起始位点。在不完整收集的毗邻序列群中（未完成的基因探测序列），MZEF 提供了最好的起点，因为这种长度的序列一般不会超过一个外显子。在处理已经完成或将要完成的序列中，更大的毗邻序列提供了大量的前后关系的信息，GENSCAN 或 HMMgene是比较好的方法。不论哪种方法，用户都必须采用至少一种其他的预测方法作为这些预测的补充，因为这些方法的一致性能够作为预测结果正确性的定性的量度。

此外，运用比较搜索的方法，如 BLAST 或 FASTA，必须考虑到完整的要求，包括用户 dbEST 和蛋白质数据库作为同源性基础的线索的目标。PROCRUSTES 应被用于当一些推断基因产物的信息已经知晓，特别是当扩增已经作为候选的手段的情况下。

解释组合方法的一个很好的例子是定位 cerebral cavernous malformation（CCM1）基因于 7q21 到 7q22。在这里，MZEF、GENSCAN、XGRAIL 和 PowerBLAST（Zhang and Madden，1997）的组合被运用于一个整合的方式中来预测基因的结构（Kuehl *et al.*，1999）。

在 the National Human Genome Research Institute 发展出来的一种组合方法，接合了大多数本单元所介绍的方法并将其整合成一个单一的工具，这个工具就是 GeneMachine，它能让用户在自动模式下要求多个外显子和基因的预测程序。Perl 模式用来运行 MZEF、GENSCAN、GRAIL2、FGENES 和 BLAST。RepeatMasker 和 Sputnik 被用来找出被要求序列中的重复成分。当 GeneMachine 运行时，会写下一个文件，这个文件随后能够被 NCBI Sequin 打开，实质上是用 Sequin 作为操作平台和图像阅读器。用 Sequin 还有一个好处就是能够将结果以用户熟悉的格式表现出来——同 Entrez for graphical views 的格式大致一样。GeneMachine 最值得注意的特点是这个过程是高度自动化的：用户只需要运行 GeneMachine 然后将结果用 NCBI Sequin 打开即可。GeneMachine 也不要求用户安装本地版本的预测程序，它能让用户以网络见面代替实际见面并且减少经常维护程序的麻烦——虽然以运行较慢为代价。在提交给 GenBank 之前 GeneMachine 能做出注释从而增加数据的内在价值。

参考文献：Rogic et al.，2001；Zhang and Madden，1997

编　　者：Andreas D. Baxevanis

单元 6.2　序列数据库：整体信息的检索和数据的提交

首先，我们要感谢如今各式各样飞速扩大的供我们使用的数据库。以 MEDLINE 为代表的生物医学数据库正以每年 400 000 篇文章的速度增长。MEDLINE，这个由美国国家医学图书馆（NLM）建立起来的数据库现在储存了摘自约 4300 种生物医学期刊的 11 000 000 出版物的参考文献信息和期刊摘要。

GenBank 是由位于 Bethesda、Maryland 的 NLM 下辖的生物技术国家信息中心（NCBI）创建并分类的一个序列数据和相关注释的储藏库。GenBank 是国际 DNA 数据库合作项目的一部分。该项目另外两个成员分别为位于日本 Mishima 的 DDBJ 和位于英国剑桥附近欧洲生物信息研究所研发的欧洲分子生物实验室（EMBL）数据库。由于这些合作者会每天进行数据交换，因此我们这里提及的“GenBank”实际包括了 GenBank、EMBL 和 DDBJ 的序列数据。

20 世纪 90 年代，新的序列数据的形式成为了一个重要的数据库入口。例如，“表达序列标签”或称作 ETS 是用 cDNA 库中随机选取得一段自动复制的“一步到位”的部分序列，它们多用来研究表达的基因。这些数据会带来一些特定的分析方面的问题（Boguski *et al.*，1993），这些问题将在本书的单元 6.3 着手解决。另外，它们还要求

数据库有特殊的批量提交的程序［见关于提交表达序列标签（EST）、序列标签位点(STS)、基因组测定序列（GSS）的讨论］。短的基因组序列，包括来自“外显子捕获法”和“外显子扩增法”，和基因组测定序列也像EST序列一样也带来了相似的分析方面的挑战。像EST提交程序一样，这些“GSS”入口也有一套特定的提交程序。大批量的全基因组的测序需要新的提交数据的方法并且已经促进了访问和显示数据新方法的发展。

数据库的同源性检索我们会在单元6.3详细描述。本单元我们集中讨论广泛多样的序列、结构和文献数据库——并讨论它们如何被整合（图6.2.1）成一个单一的好用的叫Entrez的检索环境的，这个环境在因特网上为用户提供了“一站式”的服务。

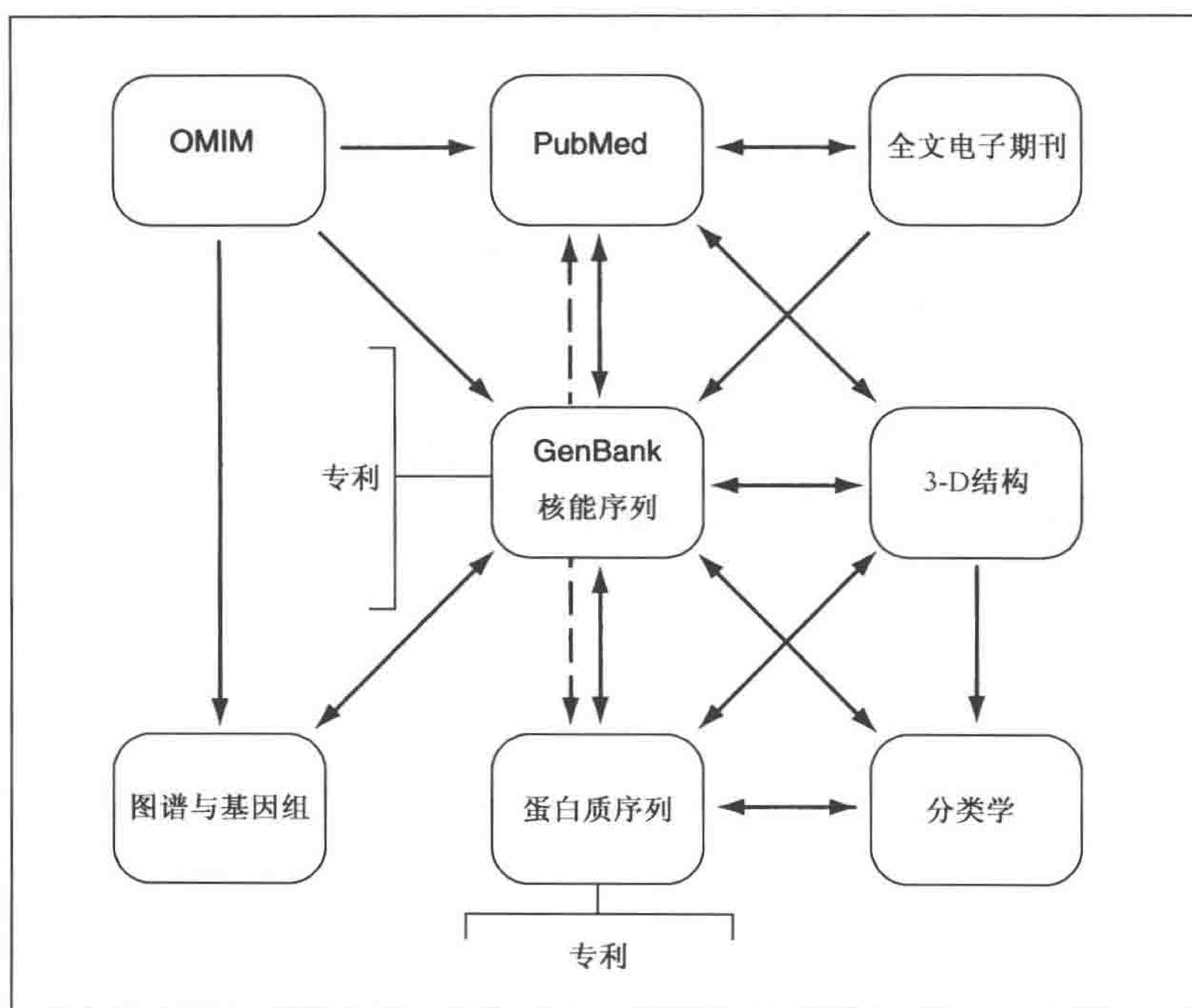


图6.2.1　Entrez系统的数据

Entrez介绍

Entrez（图6.2.1）将各种不同的信息源联系在一起：它能够访问许多数据库的核苷酸和蛋白质序列，同时也能够访问NCBI的Genomes部分、MMDB（Molecular Modeling Database of NCBI）的三维结构、OMIM（Online Mendelian Inheritance in Man）人类疾病数据、LocusLink的遗传定位数据、PubMed的文献引用（以下讨论）。Entrez可以通过互联网以客户端/服务器的形式访问（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/）。在客户端/服务器Entrez网络（NetEntrez）模式下，客户端在用户的本地机器上运行并与NCBI的服务器交换数据。客户端的程序适用于Macintosh、Microsoft Windows、Unix/X-windows和一些其他的操作系统。通过互联网的Entrez（WebEntrez）在WWW浏览器下运行。NetEntrez和WebEntrez在功能上相似，但在使用上有

所不同。WebEntrez有额外链接的优势——例如，链接到WebBLAST的结果和一些期刊的全文。NetEntrez的界面更直观，并且在有一些复杂的检索条件时会显得更方便。我们有很多方式使用Entrez，在如下一些普通的情况中我们也使用它。

Entrez通过将所有的领域组合到一个用鼠标控制的图像界面的好用系统中，充分地节省了检索需要的精力。Entrez建立了所有的DNA序列、它们编码的蛋白质和描述它们生物学文献之间的必要链接。Entrez的文献部分来自PubMed数据库，包括摘要。如果一篇摘要没有论文的全文，我们也能通过摘要中的信息从序列同源性分析和解释的结果中获得意想不到的帮助。随着期刊名单的增加，Web版的Entrez也开始有全文链接。对于许多人类疾病基因，Entrez有许多链接连到PubMed的Online Mendelian Inheritance in Man（OMIM）数据库中关于疾病描述的记录。PubMed的文献信息数据库中包含MEDLINE和PreMEDLINE中的引文（最终将成为MEDLINE记录的初步引文）。

Entrez不只单单包含不同数据库之间的外部链接，还包含数据库内部数据之间的计算链接。每天，所有部分的DNA和蛋白质序列数据库都会互相比较，所有的显著同源性都会被计算并储存在系统中。因此，我们才有可能只按一下鼠标就能迅速地对Entrez中的任何序列的同源性进行检索，而不用手动的进行新的数据库搜寻。所以，Entrez还包含了数千个未被问及的答案。

除了实现计算好序列的同源性之外，Entrez对PubMed的记录做了相似的工作。在两篇文章的有效词的使用频率的基础上计算它们统计学的关系是十分可行的做法。为了说明有效词由什么组成，我们举两个反面的例子。例如，“小说”和“重要”就不是有效词因为它们出现在大多数的学术论文中，因此它们不能用来将一篇文章在特定的内容上与其他文章区分开。每天，一“相关文献”（有时被称为“邻居”）都被重新计算。这形成了一个非常强大的信息资源。我们可以作者的名字或关键字并检索不止特定的论文还包括所有的相关材料的文献，还能扩展到其他领域的信息空间并毫不费力地来回游走于文献和序列之间。我们还可以在NCBI的Coffee Break网站上找到另外的例子(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Coffeebreak/)。这些网页描述了近来生物学的发现并包含一些指南，这些指南指示了Entrez各个部分和其他生物信息工具之间的连接。

通过Entrez和Web-based BLAST输出之间的链接使得Web版的Entrez寻找序列同源性信息变得更容易。例如，我们可以用WebBLAST做一个BLAST的搜索，列表会给出链接到Entrez蛋白质或核酸入口的超文本链接。

Entrez的其他特点还包括基于分类学基础的序列检索，通过来自NCBI分类浏览器的网页，我们能够通览生物体的名称和系统发生树并选择任何一个物种的所有核苷酸或蛋白质序列。现在Entrez中还有从序列和文献连到NCBI的分子模型数据库Molecular Modeling Database（MMDB）的蛋白质三维结构的链接。系统中还被加载了一种被称为Cn3D的三维结构的阅读器。Cn3D能够在客户端/服务器模式或以“辅助软件”的形式整合到网络浏览器中被应用。

另一种特殊的阅读器用于Entrez Genomes部分Entrez建立整个染色体的序列来呈现基因组水平的景观，这些整体序列来自于序列片段的合成以及被整合的遗传和物理图谱。Entrez能够让用户以图像或文字的方式从不同的精细水平来浏览序列信息。染色

体界面于组成 Entrez 的其他部分的数据库紧密相连，这样用户可以轻松地实现图谱、序列和文献这些部分之间的跳转。

数据的提交：大概的意见

现在，期刊都不喜欢将序列数据印刷出来因为它们占据很大的空间，而且电子版的序列会更有用。大多数期刊要求文章的作者向 GenBank、EMBL 或 DDBJ 发送他们的序列数据，获得数据库的序列号并以此作为证据。序列号是确定数据已经被提交而且能够被科研机构检索的唯一证明（由一个字母后加 5 个数字或 2 个字母后加 6 个数字组成）。将序列储存在公共数据库中，并使其能被利用被认为是一个研究者对科学界的重要责任。

GenBank、EMBL Data Library（http://www.ebi.ac.uk/submissions/index.html）和 DDBJ（http://sakura.ddbj.nig.ac.jp/）是国际数据库合作的伙伴。作者可以将他们的序列提交给任何一个方便数据库，而不用考虑那些描述这些序列的论文是在哪里发表的。序列只需提交给一个网站：每天提交的序列都会被交换给其他数据库。

因此，精确的生物学注解是非常重要的。注解的重要来源之一是关于该序列已发表的文献；NCBI（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/index.html）确实通过 MEDLINE 和 Entrez 搜索引擎尽其所能地为序列链接引文。然而，随着数据量的增长，提交即从作者处得到的电子注解变得越来越重要，因为对如此大量数据进行搜索的唯一实用方法是通过计算机检索。

提交到任何一个序列数据库的序列都会经过数据库工作人员一系列对序列准确性的验证。如果这次提交没有问题，登录号一般将在 24h 内或更短时间内返回给作者。任何关于该序列的文稿都必须包含此登录号，登录号通常出现在文章第一页的脚注中（或者按个别期刊要求的方式出现）。关于这条临时记录的全文在发表之前将寄回作者重新审阅。作者可能要求将该数据保密到出版前。

向核酸序列数据库提交序列

提交方法

如前所述，一条序列可以提交到三大序列数据库中的任何一个（“对数据提交的讨论：基本考虑”一节）。本部分将描述向 GenBank 提交序列的情况，但是读者应当谨记这个例子也适用于向 DDBJ 和 EMBL 提交序列。研究者应当向对自己而言最方便的数据库提交他们的序列，重点是只需向一个数据库提交序列即可。

如果研究者可以连接到互联网，向 GenBank 提交数据最简单的方法是使用位于 NCBI 主页上的 BankIt 工具（或者向 DDBJ 和 EMB 提交时分别使用 Sakura 和 WebIn 工具）。BankIt（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ BankIt/）允许提交者从文本处理器或者序列分析软件中简单地复制、粘贴出大部分信息和数据直接生成电子表格。BankIt 被设计成用来处理最常见的 GenBank 提交的形式，如 mRNA 记录或短基因组记录。

NCBI 还开发了一个叫做 Sequin 的独立平台提交程序，该程序可以单独运行也可以在互联网上使用。Sequin 适合于各种不同长度和复杂性的序列，包括从传统的核酸序

列（基因尺度的）、分割入口（如被剪接基因的基因组序列，其中部分内含子序列尚未确定）、含有许多注解特征的长序列（基因组尺度的）和一组相关序列的集合（如种群、系统发生学或对某个特定基因或基因区域的突变研究或病毒基因组）。它还含有一些嵌入式校正功能来增强质量保证。这个校正器可以检查出诸如物种来源信息缺乏、编码区长度错误（通过与编码的蛋白质序列比对）、在编码区中出现终止密码子、氨基酸错配或者剪接位点不一致这些错误。Sequin 可以以不同浏览形式输出数据，包括 GenBank、FASTA 和 EMBL 格式文件，还可生成包含序列特征和比对结果的图谱浏览形式。Sequin 还嵌入了一个序列编辑器，这个编辑器能在序列被编辑时每隔一段时间就自动调整序列特征。此外还有一些附加功能，包括序列分析功能——编码区自动翻译器、可读框自动找寻器，还有一项功能是用互补链替换一个序列同时还能调整其中序列特征的位置。

Sequin 能通过匿名 FTP 服务器从 NCBI 获得；关于 Sequin 更多的细节，包括所有详细文件请在 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin/index.html 上查看。

BankIt 工具适宜于提交一条序列或少量序列。Sequin 工具则进一步提供了一个数据"工作台"环境，能适用于大量数据，包括不断增加的有详细注释的小重叠群，并且最终提交到 NCBI。除了这些方法，NCBI 为更大数据集的提交建立了流线型提交程序——表达序列标签（EST）、序列标签位点（STS）、基因组概览序列（GSS）和高通量基因组测序序列（HTGS）。NCBI 提供了一种与实验室基因组序列中心信息管理系统交互的方式，以确保数据高效、及时、准确的提交。这些可选方案将在随后的单元中被更充分的讨论（见提交 EST、STS 或 GSS 数据，以及提交高通量基因组测序序列的讨论部分）。

对如何准备提交序列的说明与建议

最重要的当然是新的 DNA 序列本身。它必须没有测序错误、假克隆等错处；这方面要考虑的基本问题见以下的描述。在一些特别的例子中，如像 EST 这样的"单次"测序序列，数据通常含有模棱两可之处和测序错误；在这些情况下，就必须注意到它是作为一个"单次"测序序列提交的。

向 Genbank 提交一个序列需要知道哪些内容呢？这条序列记录要包含发布这条序列的文章的参考文献、提交者的信息、来源物种的信息。这条记录还必须包括对该序列尽量详细的描述；序列上重要的区域，如编码区、启动子区、翻译的边界，都标记上确定的特征名。这些特征在 GenBank 特征表文件中都有详细的描述，可以从匿名 FTP 服务器 http://ncbi.nlm.nih.gov 的/genbank/docs 子目录中获得。

定义行（DEFINITION）是对记录中生物学序列和来源物种的精简描述，头部（Locus）行包含了序列的长度、类型、发布到公共数据库的日期（或者经任何更新、修订或更正后的日期）。在来源区（SOURCE）的物种行（Organism）包含了完整的系统分类学分类。在文献区（REFERENCE）包含了一篇或多篇引文、提交者的姓名和地址、序列初次提交到数据库的日期。评论区（COMMENT）可能被用来包含不能兼容到特征表（FEATURES）的注释。文献行和评论行应用到完整记录时被称为"描述行"。无论出现何种可能性，注释应该表达为"合法的"特征，使用适当的句法，因为

只有这样才是可被计算机读取的方式。一个更复杂的例子，是带有详细注释的人类断裂点群聚区域的图解，GenBank 记录的登录号为 U07000，它可以从 Entrez（见上面对 Entrez 的介绍）或者 e-mail 服务器获得。

关于如何向序列数据库提交数据的更多细节请详参数据库网站及 Kans 和 Ouellette (1998) 一文。以下是准备提交序列时应当注意的 7 个重要问题。

1. 这条 DNA 序列源自什么物种?

使用 GenBank 时，为确保使用正确的遗传密码子翻译从编码区（CDS）DNA 序列产生的蛋白质，对所分离序列的来源物种进行正确的分类学分类是至关重要的（条目 4）。如果使用了错误的分类，或是线粒体来源的序列而未加以标明，就会发生不易察觉的错误翻译。正确的分类学类别对于通过 Entrez 做取回序列也很重要。

在大多数情况下，序列提交时只需要提供种（genus）和属（species）的信息，数据库的工作人员会通过以上信息从 NCBI 分类学数据库中获得完整的分类信息。如果不能获得详细的信息，研究者应该提供最接近猜想，如种名、属名或常用名，数据库的工作人员则会试图确定其恰当的分类。

由于研究者所使用的微生物物种具有极大的生物多样性，对于微生物序列的提交很重要的一点是要包含 DNA 序列来源的菌种名（strain）或序列号。这就像一些限定词，如/strain= “S288c”，在进行序列比较和试图解释一些有争议的序列时相当有用。种（strain）信息来自大鼠（如/strain= “BALB/c”）和其他一些物种做遗传作图时也很重要。

2. 这是条基因组序列还是条 mRNA（cDNA）序列?

被测序的分子通常都是 DNA，但是注释应当包含材料最初的生物学身份。例如，cDNA（即为了可以用于克隆将 mRNA 用反转录酶获得的 DNA 分子），就应该在数据库中被注释为一条 mRNA。HIV 是一个有趣的例子。HIV 序列和其他那些来自反转录病毒的序列一样，可能被不同的方式分类：作为基因组 RNA 的互补 cDNA（因而被作为 “RNA”）；作为非整合的、非前病毒的 DNA（因此作为单链 DNA 或者 “ssDNA”）；或者作为整合的、前病毒的 DNA（因此作为双链 DNA 或者 “dsDNA”）。

3. 如果是条基因组序列，是否存在序列尚未确定的内含子?

在很多情况下一个基因只有某些部分被测序，即外显子和少数几个碱基的侧翼序列。在这些情况下，就必须建立“分割入口”，其含义是研究者必须对每一个具体序列创制个别提交并且指出它们之间的关系，如它们之间的线性顺序。此外，如果一组片段之间大致的分割距离是已知的（在碱基水平或者千碱基水平），这些距离的信息就应该包括进去，这些信息会允许软件程序将完整的基因信息自动组装起来。请注意这是一个应用 Sequin 工具的极佳范例。

4. 在这条 DNA 上是否有编码区序列（CDS）或者其他 RNA 产物（rRNA 或者 tRNA）？如果有，它们在 DNA 序列上什么位置？

如果这是一条 mRNA，或者如果是一个可以编码蛋白质产物的 DNA 分子，请指明编码区出现区域并且指出它的起始和终止密码子。RNA 产物应当指示边界或者坐标。一项重要的检查是所有提交的序列都要确证坐标与指示的特征相符。如果存在任何差异，数据库负责注释的工作人员会向提交者咨询解决这个问题。

如同在问题 1 中所解释的那样，存在这样一个常见问题：在分类学信息不完整或者不正确的情况下会导致使用不正确的遗传密码子。目前有 15 种不同的遗传密码子在使用，任何未出现在此列表上的密码子，都要使用翻译例外（/transl _ except）限定词注明这种差异。

Sequin 工具有一个内置的可读框识别工具软件。使用者可以设定可读框最小的大小和遗传密码，以及 DRF Finder。序列中将展现序列的可读框。此外，另有一个独立的 ORF Finder 网址（http://www. ncbi. nlm. nih. gov. gorf/forf. html）。

5. 如果这里有一个 CDS，基因的名字和编码蛋白质的名字是什么？如果基因产物是一个酶，EC number 是什么？

在 CDS 上输入一个蛋白质或者一个基因产物的名字是标记 DNA 编码蛋白质的最好方法。它可以添加一个以上合格的，但一个产品、基因、EC number 是相当足够的。这是即将转入蛋白质数据库的标签，如 GenPept 或者 Swiss-Port。酶学委员会成员可以在世界范围内的网站 http://www. expasy. ch/enzyme/enzyme-search-ec. html 获得或修改。

6. 你的序列在这种格式上似乎没有合适位置的情况下，是否存在关于这个序列的信息？

找一个合适的位置以 BankIt 或者 Sequin 的格式输入一个给定的 feature 还存在一定的问题。在这种情况下，就附上一份说明并提交上去，数据库的工作人员会找到正确的地方，或与您联系以了解更多信息。

7. 你的序列是否准备好了提交？是否已被证实存在载体污染、线粒体 DNA、核糖体和 tRNA，以及重复元素？

利用 BLAST 程序针对特殊的数据集所代表的共同的“污染物”比较新的序列可以发现潜在问题。Sequin 的网络意识版会允许你运行 BLASTN 比对载体和线粒体的数据库。最近开发了 VecScreen 系统用于快速寻找序列中的载体污染。VecScreen 可以自动不换行接排 BankI 序列，还能够在 Sequin 内部运行。而且它可以从自己的网页上被独立应用。其他验证例程是建立 BankI 和 Sequin 提交工具。这些例程包括一个比较概念性的翻译编码区与提交的氨基酸序列，检查实际数据长度与给定的是否相符，检查是否正确使用限定物的特点，以及检查非法字符。虽然数据库的工作人员所使用的多项检验测试每一个新的序列，它能更迅速地为作者自己在提交之前解决任何问题。

递交更新或更正现有的 GenBank 输入方式

鼓励作者们提交更新或改正他们的序列记录。其实任何在一个数据库中的记录中发现一个问题、错误或遗漏的人，都应该告诉数据库的工作人员。作者忘了通知数据库先前机密序列现在可以得到释放并不鲜见。如果加入的人数被认为是在发表的文章和序列无法取回，这几乎可以肯定是如此。如果完全期刊引文供应，该数据库将发放数据，其中包括全称文件，或者如果一本扉页加上页显示索取号将被传真到数据库。

更新资料构成的一个简单的修改，如被评为改变或释放的信息都可以被提交发送电子邮件段的形式解释这个变化，信息必须包括序列索取号，随着所有更新更正或出版信息进行更新。

可通过递交 Banklt 或 Sequin 来进行更新，详见 Banklt 或 Sequin 网页（如何向核酸数据库递交序列，以及递交方法）。

递交 EST、STS 或 GSS 数据

表达序列标签（EST）、序列标签位点（STS）、基因组概览序列（GSS）通常递交到 GenBank 与专业数据库，如 dbEST、dbSTS 或 dbGSS，但这些数据库是冗余数据库，不论在引用数据还是数据递交，以及数据库本身提供的信息量来看，均含有大量的冗余数据。同时，这些数据库，也设置了特殊的程序以提高递交的效率，如一种特殊的“平接式文件夹”输入格式。向 info@ncbi. nlm. nih. gov 递交提问即可获得关于这些文件的描述。此外，也可从 dbEST、dbSTS 或 dbGSS 网址中获得相应的描述，网址分别是：http://www. ncbi. nlm. nih. gov/dbEST/、http://www. ncbi. nlm. nih. gov/dbSTS/、http://www. ncbi. nlm. nih. gov. dbGSS/。如需要递交的数据已准备好，可将其发电子邮件到 batch-sub@ncbi. nlm. nih. gov。如果需要递交批量数据，可在 FTP 中设置一个账号，这样可以保存大量的数据。如需了解更多的信息，可发电子邮件给 info@ncbi. nlm. nih. gov。

提交高通量的基因组序列 HTGS

一些群体可能发现他们的需要不能便利地被标准的数据提交方法支持，比如说拥有自己信息输入系统的基因组中心或者一组装配一个非常大的重叠。NCBI、EBI 或者 DDBJ 的员工们很乐意谈论那些问题，并且为这类群体做出特别的安排，因此他们的数据能够很方便地纳入数据库。这包括设立自动交换数据、建立特殊的 FTP 账户，以及生成工具，以保证最有用的数据交换格式。比如说，在 NCBI，为基因组测序中心建立 FTP 账户，并且为提交高通量基因序列创建一种工具。

大型测序操作希望开发一项完整的直接提交系统，或者对于那些具有不能被标准工具处理的数据提交问题的研究人员，可以发送电子邮件到 info@ncbi. nlm. nih. gov。这种应该尽可能地解释清楚，并且提供电话号码和地址以便 GenBank 的工作人员能够接触研究者，探讨他们碰到的问题。

参考文献：Baxevanis *et al.*，1997；Boguski *et al.*，1993

编　　者：Jane M. Weisemann，Mark S. Boguski，and B. F. Francis Ouellette

单元 6.3　使用 BLAST 程序家族查找序列相似性

近年来，开发了大量算法用来做序列数据库搜寻。这些工具中最有用的部分应具有以下一些特点。①速度。因为现在的数据库如此之大，这些程序必须足够快以至于能在数秒内处理序列的百万碱基。②灵敏度。程序必须返回所有潜在的相关序列。③严密的统计分析。程序必须有办法评价结果的显著性。④使用方便。没有经过序列分析算法正规训练的科学家能理解如何使用程序和解释结果。高级用户还应该能选择程序来适应他们的需要。⑤能赶上数据库的即时升级。GenBank 数据库数据每大约 16 个月就会增加一倍，能搜寻最近更新的数据库版本非常重要。

BLAST（Basic Local Alignment Search Tool）序列相似性搜寻程序家族能满足上述标准。简而言之，用户可以输入不论是核苷酸还是氨基酸序列，同时查询核苷酸或氨基酸序列数据库。这个程序会返回一系列“击中”的序列，与查询序列比对并且做出统计评估。本单元描述怎样选择一个合适的 BLAST 程序和数据库，运行查询和解释结果。

使用 BLAST 程序和文件

美国国家生物科学信息中心（NCBI）支持一些 BLAST 版本并免费面向公众。BLAST2.0 或“gapped BLAST”是 BLAST 的基础版本，它允许用户使用感兴趣的核苷酸或者蛋白质序列搜寻序列数据库。BLAST2.0 在查询序列和目标序列之间设置间隙，使得在二者之间的相似序列能作为一整个比对结果返回。特定位置重复 BLAST（PSI-BLAST）是一个重复 BLAST 查询，是寻找远端相关序列的优化程序。PHI-BLAST 程序能查询蛋白质中的保守模块（zhang *et al.*，1998）。“BLAST-2-序列”程序用来比对用户自己键入的两个序列。在“特异性 BLAST”网页上，研究者可以搜寻还未在 GenBank 数据库登录的序列。目前，这些数据库中包含了所有已完成和未完成的微生物基因组序列、P. falciparum（人类疟疾寄生虫）、人类基因组序列和免疫球蛋白序列（IgBLAST）。“VecScreen”能辨别通过运行 BLAST 对载体数据库进行搜寻的潜在的载体污染。

最简单和最流行的进入 BLAST 程序的方法是通过访问 NCBI 因特网，http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/。所有版本的 BLAST 程序均能从该网页上获得，并能用于查询所有的 NCBI 中的可获得的序列数据库。描述常见问题（FAQ）的文件也能在这里获得，它包含一个 BLAST 的概观，和一个“最新有什么”的网页、BLAST 手册、参考文献的列表。

对于那些希望运行 BLAST 搜寻私人本地数据库或者下载 NCBI 数据库备份的用户，NCBI 提供一个 BLAST 程序的独立版本。BLAST 二进制算法和文件能提供用于 IRIX、SOLARIS、DEC OSF1 和 Win32 系统等不同系统的最新版本。

BLAST 还能作为一个客户服务程序运行，这样用户安装客户端软件在本地电脑上能直接与 NCBI 上的服务器通过网络交换数据。这种设置对于在 NCBI 数据库中运行大

量查询的用户来说很有用，因为他们能在自己的本地电脑上自动运行程序。

NCBI BLAST 电子邮件服务是不能便利上网的人群的最佳选择。相似性搜寻的研究能通过发送一个有正式格式的电邮（包含核苷酸或者蛋白质查询序列的信息）给 blast@nvbi. nlm. nih. gov 来完成。这个待查询序列会与特定的数据库进行比较，结果会以邮件形式返回。为了获得更多关于阐述“电邮 BLAST 查询”的信息，请发送包含 HELP 字样的信息至相同的地址，blast@nvbi. nlm. nih. gov。

Blast 简介

标准 Blast 查询与高级 Blast 查询

Blast 2.0 提供了两种可供查询的版本——标准版与高级版。在这两个版本中用户均能对查询所需的 Blast 程序类型与数据库进行选择，且可以选择是否过滤掉掩饰了低复杂度区域的查询序列（如下所述）；其中，高级版还允许用户自行修改参数。对于大多数研究者而言，使用默认参数的标准版就已足够。关于 Blast 参数的选择请详见本单元末附录 A。

Blast 程序

现已开发出 5 种 Blast 程序，可支持使用不同的核酸和蛋白质序列或数据库进行序列相似性查询。表 6.3.1 中列出了这些程序并分别加以说明，请根据希望得到的信息类型选择执行适当的 Blast 程序。

表 6.3.1　Blast 查询程序

程序名	搜索序列	数据库序列	备注
BLASTP	蛋白质	蛋白质	能在标准模式或更高敏感性的重复模式（PSI-Blast）下运行，能根据之前检索的结果建立之后进行相似性检索的范围
BLASTN	核酸	核酸	对速度进行了参数优化，不考虑敏感性；不查找相关性较远的编码序列。能自动检查查询序列的互补链
BLASTX	核酸（6 种可读框翻译）	蛋白质	对包含潜在的移框错误的原始数据非常有用（EST、HTG 和其他“单次 single-pass”序列）
TBLASTN	蛋白质	核酸（6 种可读框翻译）	对用蛋白质条目查询 EST 数据库是必要的。常被用来寻找数据库中还未记录的可读框或移框错误
TBLASTX	核酸（6 种可读框翻译）	核酸（6 种可读框翻译）	仅用于 BLASTN 和 BLASTX 查询无结果时使用。限制于搜索 EST、STS、HTGS、GSS 和 Alu 数据库

NCBI 数据库

在序列相似性搜索中会犯的一个常见的错误是没查询最新的数据库。由 NCBI 产生 GenBank 数据库并对它进行每天更新。GenBank 数据库也会每天与日本的（DDBJ）和

欧洲的（EMBL）DNA 数据库交换数据资源。通过使用 BLAST 网页、客户端或 E-mail 服务搜索 NCBI 数据库，保证能获得最新的数据库。NCBI 支持许多序列相似性查询的数据库，这些数据库被及时更新，当前目录和描述可从 NCBI 网页（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_databases.html）获得。

做 BLASTP 和 BLASTX 比对用的肽序列数据库

nr.　nr（非冗余）数据库是更综合性的数据库。GenBank、DDBJ 和 EMBL 都是核苷酸序列数据库。若任一个数据库中的核苷酸序列被用编码序列（CDS）注释，则此 CDS 会出现在 nr 数据库中。nr 数据库也包括从 PDB（Brookhaven 蛋白质数据库中有 3D 结构的序列）、Swiss-Prot（蛋白质序列数据库）、PIR（Protein Identification Resouce，蛋白质鉴定资源，一个综合性蛋白质序列收集机构）和 PRF（Protein Research Foundation，蛋白质研究基金会）中获得的蛋白质序列。虽然 nr 可能包含相似性序列的多份拷贝，但是鉴定序列将合并成一个条目。被合并的两条序列必须有相同的鉴定长度而且在每个位置的核苷酸残基都是一致的。nr 数据库有多肽和核苷酸序列，多肽数据库是自动选择 BLASTP 和 BLASTX 搜索的。

month　Month 数据库仅收录与 nr 来源相同，但至少 30d 内发表的数据。month 中所有数据也在 nr 中出现。

果蝇基因组（Drosophila genome）　此数据库包含由 Celera 和 Berkeley 果蝇属基因组计划（Drosophila Genome Project，BDGP）提供的果蝇基因组蛋白质。如果有还未在数据库中提交的果蝇序列，其他研究人员可提交。

醇母 Yeast　酵母数据库提供 NCBI 的酿酒酵母参考序列。酵母基因组数据库（*Saccharomyces* Genome Database，SGD；http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/）提供了酵母的 16 个染色体和一个线粒体的序列和注解。

E. coli　*E. coli* 数据库来源于大肠杆菌（*Escherichia coli*）K-12。

Pdb　Pdb 包含来自于一个 3D 结构的数据库，Brookhaven 蛋白质数据库。

Alu　Alu 数据库包含所有 Alu 亚科（附录 2A）中有代表性的 Alu 重复的 6 种不同可读框的翻译。如果在使用 BLAST 搜索 nr、month 或 HTGS 中查询序列包含一个 Alu 重复序列，许多得分高的结果将也包含 Alu 序列。如果一个意外的高得分的数字返回是人类查询，用此查询来鉴定任何可能产生潜在的错误比对的 *Alu* 重复位置是对搜索 Alu 数据库有用的。

做 BLASTN、TBLASTN 和 TBLASTX 用的核苷酸序列数据库

nr　nr 数据库包含 GenBank、EMBL、DDBJ 中所有核苷酸序列。它也包含从 PDB（与 Brookhaven 蛋白质数据库中 3D 结构相关的序列）中获得的核苷酸序列。nr 仅包含正规的、已被注解的序列，因而它不包含 EST（expressed sequence tag，表达序列标志）、STS（sequence tagged site，序列标记位点）、GSS（genome survey sequence，基因组测量序列）或 HTG（high throughput genomic，高流通量基因组）序列。nr 不再是非冗余数据，可能是已确定序列的多个提交拷贝。

month　Month 数据库包含在 DDBJ 和 PDB 中最近 30d 内发表的所有核苷酸序列。

不同 nr 的是它包含最近一个月内的 EST、STS、GSS 和 HTG 序列。

EST　EST 存取在 GenBank、EMBL 和 DDBJ 中出现的所有的 EST 的一份非冗余拷贝。EST 都是短序列，少数长度上百个核苷酸，其来源于随机选择的 cDNA 克隆的嵌入物产生的部分的单向序列。随着 EST 数量飞速增加，它成为搜索新的 cDNA 的重要数据库。

STS　STS 包含在 GenBank、EMBL 和 DDBJ 中出现的所有的 STS 的一份非冗余拷贝。STS 是短的独一无二的基因组序列，被用于基因组定位成就的序列标记。

HTGS　HTGS 包含高流通量测序中心产生的"未完成的"DNA 序列。典型的 HTG 记录可能包括从单个质粒、BAC、YAC 或 P1 克隆产生的所有第一遍（first-pass）测序数据。记录由两个或多个序列片段组成全长≥2kb，包含一个或多个缺口(gaps)。通常由测序中心更新序列，以提供更多数据。记录更新时不改变登录号，仅在 GenBank 中保留最近版本的记录。第 1 相 HTG 序列为无规律的无向的缺口重叠群。第 2 相 HTG 序列是有规律有向的有或无缺口的重叠群。所有的 HTG 记录包含醒目的告诫，声明此序列是未完成的和可能包含错误。当一个记录认为是完成的，它成为第 3 相 HTG，并用相同的登记点移至 nr 数据库中。HTGS 是尚未在 nr 内的新基因组序列的重要来源。

GSS　GSS 包含通过不同方法鉴定出的短的、单向基因组数据。许多序列已经定位。

Drosophila genome（果蝇属基因组）、yeast、*E. coli* 和 *pdb*　在本单元中的这些数据库的目录类似于多肽数据库所描述的（多肽序列数据库 BLASTP 和 BLASTX 中的讨论）。

Alu　Alu 数据库包括在所有 Alu 亚家族（附录 2A）中典型的 Alu 重复。如果用 BLAST 搜索上述的核苷酸数据库的查询序列中包含一个 Alu 重复，许多高得分结果中将也包括 Alu 序列。这可能是有用的，尤其是用基因组序列查询，去搜索 Alu 数据库，来鉴定任何 Alu 重复位置，这些 Alu 重复会导致高得分和潜在错误配对。一个容易的替代方法是对人类重复序列过滤，在高级 BLAST 搜索中优化选项。

Vector（载体）　Vector 数据库包括许多载体的标准核苷酸序列。一个新的序列应该筛选 Vector 数据库以确定没有包含任何载体污染。

Mito　Mito 数据库（线粒体数据库）包括从＞125 种生物完整基因组序列。核衍生序列应该筛选 Mito 数据库以确定没有包含任何线粒体污染。

查询序列格式

通过输入序列本身，或者如果序列已在序列数据库中可输入登录号或 gi（本单元末的附录 B），BLAST 网页用户就可开始一个搜索。输入新序列的首选格式是所谓的 FASTA 格式，然而，如果此序列不是 FASTA 格式或此序列是数字或空格隔开的，BLAST 仍然可接受此查询。FASTA 格式的序列是单行描述的，其后一行为序列数据。在第一列用一个"＞"（大于）符号把描述行与序列数据相区别。一个 FASTA 格式的序列，如

>aaseq Human choroideremia protein
MADNLPTEFDWIIGTGLPESILAAACSRS-
GQRVLHIDSRSYYGGNWASFSFSGLLSWLKE
YQQNNDIGEESTVVWQDLIHETEE-
AITLRKKDETIQHTEAFPYASQDMEDNVEEIGALQKN
PSLGVSNTFTEVLDSALPEESQLSYFNS-
DEMPAKHTQKSDTEISLEVTDVEESVEKEKYCG
DKTCMHTVSDKDGDKDESKSTVEDKADE-
PIRNRITYSQIVKEGRRFNIDLVSKLLYSQGLL
IDLLIKSDVSRYVEFKN-
VTRILAFREGKVEQVPCSRADVFNSKELTMVEKRMLMKFLTFCL
EYEQHPDEYQAFRQCSFSEYLKTKKLTPN-
LQHFVLHSIAMTSESSCTTIDGLNATKNFLQC
LGRFGNTPFLFPLYGQGEIPQGFCRM-
CAVFGGIYCLRHKVQCFVVDKESGRCKAIIDHFGQ
RINAKYFIVEDSYLSEETCSNVQYKQIS-
RAVLITDQSILKTDLDQQTSILIVPPAEPGACA
VRVTELCSSTMTCMKDTYLVHLTCSSSK-
TAREDLESWKKLFTPYTETEINEEELTKPRLL
WALYFNMRDSSGISRSSYNGLPSNVYVCS-
GPDCGLGNEHAVKQAETLFQEIFPTEEFCPPp
PNPEDIIFDGDDKQPEAPGTNNVVMAKLESSEESKNLESPEKHLQN

另外，用户还可输入数据库登录号或 gi 号。事实上，以上的序列已在数据库中以 gi 标识符 116365 和一个 Swiss-Prot 登录号 P26374 存在。或者这些序列标识符在 BLAST 页中输入。标识符的类型（核苷酸或蛋白质序列）必须与用在搜索的查询序列类型相配。手稿中的序列常指它们的 GenBank 登录号，然而，这登录号指核苷酸（非蛋白质）序列，且不能用于开始 BLASTP 或 TBLASTN 搜索，两者都要求蛋白质序列查询。由核苷酸登录号编码的蛋白质的标识符可通过搜索 NCBI 的 Entrez 核苷酸数据库（http://www.cbi.bn.nih.gov/Entrez）。

过滤序列

核苷酸和蛋白质序列两者可能包含低复杂区域，如同聚合束区域、短周期重复或富集一个或少数残基。

这样的低复杂区域经常产生假的高 BLAST 得分，其反映的是组成偏倚而不是位置对位置的对比有意义。例如，两个蛋白质序列包含富集相同的氨基酸的低复杂区域，可能在不分那些区域产生高的比对得分，尽管蛋白质的其他部分完全不同。

过滤查询序列（指用字符串 n 代替重复序列或 X 代替蛋白质序列）能消除潜在的混淆配对，如在数据库中的低复杂脯氨酸富集区域、多聚腺苷酸尾或 Alu 单元。在默认状态下所有通过 NCBI 的 BLAST 网页的检索、BLAST 客户端、E-mail 服务器和独

立程序自动过滤查询中的低复杂序列。在标准和高级 BLAST 网页能“关闭”这种过滤功能。BLASTN 查询过滤 DUST（R. L. Tatusov and D. J. Lipman，pers. comm.）。其他 BLAST 查询用 SEG。过滤人类重复默认是“关闭”的，且在高级 BLAST 页面中的选择框中能“打开”。缺省状态下过度序列在最后的 BLAST 报告中用字符串 n 或 X（如 nnnnnnnnnn 或 XXXXXXXXX）来表示。在高级 BLAST 网页中也有掩盖低复杂或人类重复序列选择项仅在查找表中有。当框被选中，仅在开始 BLAST 搜索的起始时掩码，和在 BLAST 报告中用 n 或 X 代替。

接收 BLAST 结果

缺省状态下，在网页浏览器窗口提供 BLAST 结果。文件将有超文本链接，使之易于分析结果。在下午中段 BLAST 服务器可能会很忙。因此，有时通过 E-mail 接收 BLAST 结果更有效。发送的 E-mail 结果是纯文本或 HTML 格式，因结果文件包含超文本链接，HTML 格式结果必须用网页浏览器打开。

通常，BLAST 查询按它们接受的顺序处理的，然而 NCBI 的 BLAST 网页服务是共享资源，它将被少量用户垄断而变得不公平。为避免这样，服务器记录每个用户的队列有多少查询和惩罚那些队列中有许多查询的用户。

BLAST 检索实例

BLASTP

BLASTP 程序对一条查询的蛋白质到蛋白质数据库进行比对。当选择 Swiss-Prot 数据库，程序就改为 BLASTP。例如，在输入框中输入一条人类 choroideremia 蛋白（一种遗传学眼盲相关蛋白）的 FASTA 格式查询，在结果页的头部是关于该程序（BLASTP）的一些标题信息：版本号（2.0.5）和发布时间，版本号和发布时间是随程序更新而改变的，同时还会列出参考文献、查询定义路线和所使用数据库的摘要信息。图 6.3.1 列出了查询结果的图形预览，列出了查询比对选中的数据库，其顶部有显示其数字的工具条。在其下前三条显示高得分的匹配数据，在整个长度对齐查询序列。在其下 9 条显示低得分的匹配数据，其对齐查询序列的两个区域——一条是查询序列的残基 3 或 4 至约残基 60，另一条内残基 220～500。从这 9 条中稳定的区段（在其左右）表示对齐区域；画有交叉影线的区段表示这两条序列在相同数据库中对齐（如稳定段），但是在画有影线的区段没有对齐。如果在相同排中（如第 13 排）有两个或多个条中无交叉影线，这表示无关数据序列对齐不同。这些条在图形示意图中显示在相同列 conserve space。移动光标在图的条上（“鼠标移动”）使匹配的数据的标识符和定义行显示在窗口中。如用 E-mail 发送 BLAST 搜索结果，则不包括图形显示。

图 6.3.2 显示了 BLASTP 搜索产生的数据。每行列出数据由四部分组成。第一部分包含数据库命名、登录号和匹配序列的位点名，由直条分离（本单元末附录 B 的详细信息）。第二部分包含一个序列的简短文字描述、定义行。定义行的内容根据在数据库中间或之外而不同，但经常包括序列来源物种的信息、序列类型（如 mRNA 或 DNA）和一些关于功能或表型的信息。在击中目录里定义行常被缩短来保持显示简洁，

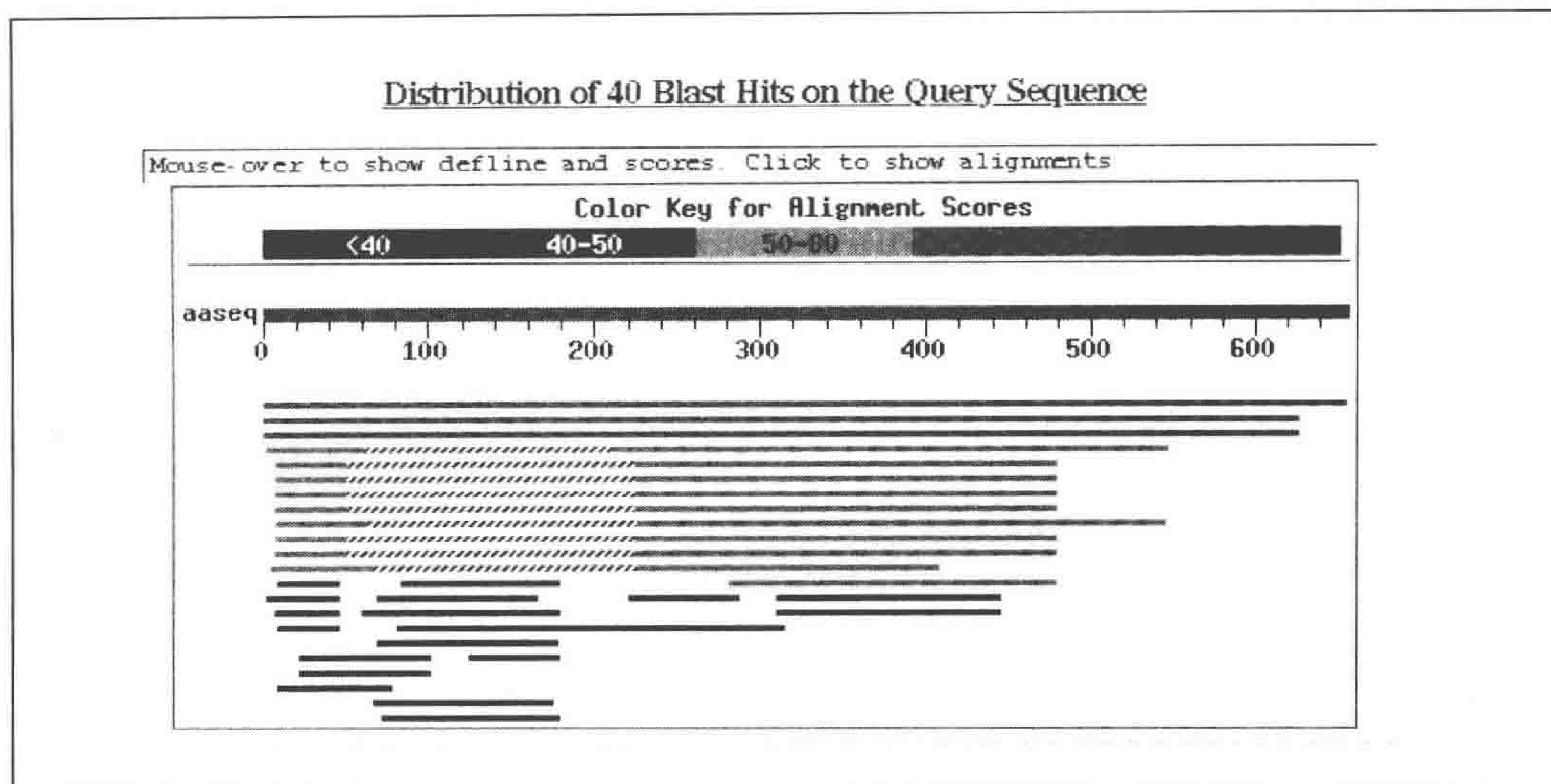


图 6.3.1　BLASTP 报告的图形显示例子。因数据匹配的长度不同而标明条的颜色。最匹配（得分>200）为红色，然后是紫色（得分 80～200）、绿色（50～80）、蓝色（40～50）和黑色（<40）。

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
sp|P26374|RAE2_HUMAN RAB PROTEINS GERANYLGERANYLTRANSFERASE COM...	1223	0.0
sp|P24386|RAE1_HUMAN RAB PROTEINS GERANYLGERANYLTRANSFERASE COM...	881	0.0
sp|P37727|RAE1_RAT RAB PROTEINS GERANYLGERANYLTRANSFERASE COMPO...	856	0.0
sp|P39958|GDI1_YEAST SECRETORY PATHWAY GDP DISSOCIATION INHIBITOR	127	6e-29
sp|P50397|GDIB_MOUSE RAB GDP DISSOCIATION INHIBITOR BETA (RAB G...	124	5e-28
sp|P21856|GDIA_BOVIN RAB GDP DISSOCIATION INHIBITOR ALPHA (RAB ...	122	1e-27
sp|P50398|GDIA_RAT RAB GDP DISSOCIATION INHIBITOR ALPHA (RAB GD...	122	1e-27
sp|P31150|GDIA_HUMAN RAB GDP DISSOCIATION INHIBITOR ALPHA (RAB ...	122	2e-27
sp|P50395|GDIB_HUMAN RAB GDP DISSOCIATION INHIBITOR BETA (RAB G...	121	4e-27
sp|Q10305|YD4C_SCHPO PUTATIVE SECRETORY PATHWAY GDP DISSOCIATIO...	121	4e-27
sp|P50399|GDIB_RAT RAB GDP DISSOCIATION INHIBITOR BETA (RAB GDI...	120	7e-27
sp|P32864|RAEP_YEAST RAB PROTEINS GERANYLGERANYLTRANSFERASE COM...	98	5e-20
sp|P50396|GDIA_MOUSE RAB GDP DISSOCIATION INHIBITOR ALPHA (RAB ...	80	9e-15
sp|Q49398|GLF_MYCGE UDP-GALACTOPYRANOSE MUTASE	35	0.35
sp|P24588|AK79_HUMAN A-KINASE ANCHOR PROTEIN 79 (AKAP 79) (CAMP...	35	0.46
sp|P36225|MAP4_BOVIN MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 4 (MICROTUB...	34	0.79
sp|Q46337|SOXA_CORSP SARCOSINE OXIDASE ALPHA SUBUNIT	34	0.79
sp|P30599|CHS2_USTMA CHITIN SYNTHASE 2 (CHITIN-UDP ACETYL-GLUCO...	33	1.4
sp|P53911|YNN6_YEAST HYPOTHETICAL 49.4 KD PROTEIN IN NAM9-FPR1 ...	32	2.3
sp|P75499|GLF_MYCPN UDP-GALACTOPYRANOSE MUTASE	32	2.3
sp|P37747|GLF_ECOLI UDP-GALACTOPYRANOSE MUTASE	32	3.1
sp|P40142|TKT_MOUSE TRANSKETOLASE (TK) (P68)	32	4.0
sp|P10587|MYSG_CHICK MYOSIN HEAVY CHAIN, GIZZARD SMOOTH MUSCLE	32	4.0
sp|P50137|TKT_RAT TRANSKETOLASE (TK)	32	4.0
sp|Q02455|MLP1_YEAST MYOSIN-LIKE PROTEIN MLP1	31	5.2
sp|P52538|DNBI_HSV6Z MAJOR DNA-BINDING PROTEIN (MDBP)	31	6.9
sp|P52338|DNBI_HSV6U MAJOR DNA-BINDING PROTEIN (MDBP)	31	6.9
sp|P37637|YHIV_ECOLI HYPOTHETICAL 111.5 KD PROTEIN IN HDED-GADA...	31	9.0
sp|Q02469|FRDA_SHEPU FUMARATE REDUCTASE FLAVOPROTEIN SUBUNIT PR...	31	9.0
sp|Q01550|TANA_XENLA TANABIN	31	9.0
sp|P49731|MIS5_SCHPO MIS5 PROTEIN	31	9.0

图 6.3.2　BLASTP 报告数据显示的例子。

但和局部比对（见如下）有联系的则完全显示。第三部分包含比对的比特（bit）得分。高得分数据在目录的上端。通俗的讲，在公式中考虑对齐相似或相同的残基从而计算得分，如为对齐序列，任何缺口必须引进。在计算中关键要素是“取代矩阵”，其对齐任何可能的残基对赋值一个得分。BLAST 默认的是 BLOSUM-62 矩阵，它对绝大多数搜

索效果好。第四部分包含预期（expect，E）值，其提供一个统计学显著性的估计。E 值反映偶然发生多少次预期的得分 E。统计学家将考虑 E 值 <0.05 为有显著性；然而，要求检查比对以确定生物学显著性。在显示的目录中最大数设定默认值为 500。这数值在高级 BLAST 页面的描述项中可被更改。

在目录的首行击中的行中，数据库标志是 sp（for Swiss-Prot），登录号是 P26374，基因位点是 RAE2 _ HUMAN，定义行以 RAB PROTEINS 开始，得分 1223 和 E 值为 0.0。

得分越高和 E 值越低，其越有统计学显著性。在首先的 13 行其 E 值都较低（$<10^{-14}$）且可能为 RAB 蛋白或 GDP 解离抑制因子。接后 18 个数据匹配有较高 E 值（$\geqslant 0.35$），意味着大约一个此得分的匹配将期望偶然发生。而且，定义行不再显示相同的一致性。假设不合理的定义行和高 E 值组合，在查询和 18 低得分数据之间推论进化关系应有警告。为了确定最终的结论检查比对是必需的。

查询和数据库之间的配对对齐显示在目录下。图 6.3.3 显示在查询序列和数据库之间的一条序列比对；为简明而省略了其他比对。

```
 sp|P37727|RAE1_RAT RAB PROTEINS GERANYLGERANYLTRANSFERASE COMPONENT A 1 (RAB ESCORT
          PROTEIN 1) (REP-1)
          Length = 650

 Score =  856 bits (2188), Expect = 0.0
 Identities = 433/632 (68%), Positives = 491/632 (77%), Gaps = 13/632 (2%)

Query: 1   MADNLPTEFDVVIIGTGLPESILAAACSRSGQRVLHIDSRSYYGGNWASFSFSGLLSWLK 60
            MADNLP++FDV++IGTGLPESI+AAACSRSGQRVLH+DSRSYYGGNWASFSFSGLLSWLK
Sbjct: 1   MADNLPSDFDVIVIGTGLPESIIAAACSRSGQRVLHVDSRSYYGGNWASFSFSGLLSWLK 60

Query: 61  EYQQNNDIGEESTVVWQDLIHETEEAITLRKKDETIQHTEAFPYASQDMEDNVEEIGALQ 120
            EYQ+NND+  E+++ WQ+ I E EEAI L  KD+TIQH E F YASQD+  +VEE GALQ
Sbjct: 61  EYQENNDVVTENSM-WQEQILENEEAIPLSSKDKTIQHVEVFCYASQDLHKDVEEAGALQ 119

Query: 121 KNPSLGVSNTFTEVLDSA---LPEESQLSYFNSDEMPAKHTQKSDTEISLEVTDVEESV 176
            KN +   S   E  ++A    LP    +      S E+PA+ +Q    E S EV D E +
Sbjct: 120 KNHASVTSAQSAEAAEAAETSCLPTAVEPLSMGSCEIPAEQSQCPGPESSPEVNDAEATG 179

Query: 177 EKEKYCGDKTCMHTVXXXXXXXXXXXXTVEDKADEPIRNRITYSQIVKEGRRFNIDLVSK 236
            +KE                        V+D  + P +NRITYSQI+KEGRRFNIDLVS+
Sbjct: 180 KKEN--------SDAKSSTEEPSENVPKVQDNTETPKKNRITYSQIIKEGRRFNIDLVSQ 231

Query: 237 LLYSQGLLIDLLIKSDVSRYVEFKNVTRILAFREGKVEQVPCSRADVFNSKELTMVEKRM 296
            LLYS+GLLIDLLIKS+VSRY EFKN+TRILAFREG VEQVPCSRADVFNSK+LTMVEKRM
Sbjct: 232 LLYSRGLLIDLLIKSNVSRYAEFKNITRILAFREGTVEQVPCSRADVFNSKQLTMVEKRM 291

Query: 297 LMKFLTFCLEYEQHPDEYQAFRQCSFSEYLKTKKLTPNLQHFVLHSIAMTSESSCTTIDG 356
            LMKFLTFC+EYE+HPDEY+A+    +FSEYLKT+KLTPNLQ+FVLHSIAMTSE++  T+DG
Sbjct: 292 LMKFLTFCVEYEEHPDEYRAYEGTTFSEYLKTQKLTPNLQYFVLHSIAMTSETTSCTVDG 351

Query: 357 LNATKNFLQCLGRFGNTPFLFPLYGQGEIPQGFCRMCAVFGGIYCLRHKVQCFVVDKESG 416
            L ATK FLQCLGR+GNTPFLFPLYGQGE+PQ FCRMCAVFGGIYCLRH VQC VVDKES
Sbjct: 352 LKATKKFLQCLGRYGNTPFLFPLYGQGELPQCFCRMCAVFGGIYCLRHSVQCLVVDKESR 411

Query: 417 RCKAIIDHFGQRINAKYFIVEDSYLSEETCSNVQYKQISRAVLITDQSILKTDLDQQTSI 476
            +CKA+ID FGQRI +K+FI+EDSYLSE TCS VQY+QISRAVLITD S+LKTD DQQ SI
Sbjct: 412 KCKAVIDQFGQRIISKHFIIEDSYLSENTCSRVQYRQISRAVLITDGSVLKTDADQQVSI 471

Query: 477 LIVPPAEPGACAVRVTELCSSTMTCMKDTYLVHLTCSSSKTAREDLESVVKKLFTPYTET 536
            L VP  EPG+  VRV ELCSSTMTCMK TYLVHLTC SSKTAREDLE VV+KLFTPYTE
Sbjct: 472 LAVPAEEPGSFGVRVIELCSSTMTCMKGTYLVHLTCMSSKTAREDLERVVQKLFTPYTEI 531

Query: 537 EINEEELTKPRLLWALYFNMRDSSGISRSSYNGLPSNVYVCSGPDCGLGNEHAVKQAETL 596
            E   E++ KPRLLWALYFNMRDSS ISR  YN LPSNVYVCSGPD GLGN++AVKQAETL
Sbjct: 532 EAENEQVEKPRLLWALYFNMRDSSDISRDCYNDLPSNVYVCSGPDSGLGNDNAVKQAETL 591

Query: 597 FQXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDGDDKQPEAP 628
            FQ                    DGD  Q E P
Sbjct: 592 FQQICPNEDFCPAPPNPEDIVLDGDSSQQEVP 623
```

图 6.3.3　BLASTP 序列比对的例子。

图 6.3.3 右边一行所描述的分数提供链接到查询和命中的比对页码。

BLASTX

BLASTX 是核酸序列到蛋白质库中的一种查询，先将核酸序列翻译成蛋白质序列（一条核酸序列会被翻译成可能的 6 条蛋白质序列），再对每一条做一对一的蛋白质序列比对。当研究人员有一个已经测序了的 DNA 分子，但不知道它的编码序列的可读框，不知道可读框的开始和结尾部位，或者编码蛋白质的功能，他们常常用 BLASTX 来查询。对于分析包括潜在序列和框移错误（如 EST、HTG 或 GSS）的初级序列数据也是非常有用的。利用 BLASTX 查询 nr 蛋白质数据库能够迅速查询到在核苷酸序列和特征性蛋白中所有的可读框中的所有相似序列。

用 nr 蛋白质数据库查询时，结果和同 BLASTP 中所得结果是相似的。顶端是搜索信息，包括查询序列、数据库序列、所用 BLAST 程序的类型。下面的表格概括提供了数据库命中序列和查询序列。查询序列后一行时命中序列，包括它们的界限、分数和 E 值。接下来是查询序列和命中序列的配对比对。

TBLASTN

TBLASTN 是蛋白质序列到核酸库中的一种查询，它是将库中的核酸序列翻译成蛋白质序列（一条核酸序列会被翻译成可能的 6 条蛋白质序列），再同所查序列做蛋白质与蛋白质的比对。TBLASTN 查询程序对于从非特征性的、低量核苷酸序列中发现异常相似的可读框中的蛋白质序列非常有用，如那些在 EST、STS、HTGS 和 GSS 中发现的数据。这些序列的翻译在 nr 数据库中没有提供，因为这些序列没有被标注。TBLASTN 的最常见用途是查询一个和你所感兴趣的蛋白质相似的 EST。这些 EST 可能代表来自不同物种的蛋白质的同源性，或者仅仅是一个基因家族的又一成员。

下面的例子显示用 TBLASTN 查询 HTGS，HTGS 是一个包括由基因组测序中心提供的没有完成的和没有特征性的基因组序列。因为 HTG 常常是包含内含子的基因组序列，所以结果比 EST 搜索结果更难翻译。然而 HTG 能够提供染色体的基因组织内部结构。

例如，用 HTGS 来查询老鼠 ADAM1 的解聚素样区域氨基酸序列。TBLASTN 的输出结果与 BLASTP 和 BLASTX 相似，它显示一个图表概览，包括比对、命中序列、位于查询序列和命中序列之间的被选择的配对比对序列。对于 TBLASTN 查询系统，比对的上行（query）包括蛋白质序列、局部相关氨基酸；下行（Query）包括一个翻译的核苷酸序列、相关的核苷酸局部序列。

BLASTN

举个例子说明，利用 BLASTN 查询，从 U93237 检入人类 EST 数据库。U93237 是含有 9.2kb 的基因组序列，是人类Ⅰ型多发性内分泌瘤病的相关基因（MEN1）。这个例子显示在 BLAST 中查询基因组序列中特定外显子的能力，同时显示没有进一步深入调查研究就接受结果的危险性。4000～9000 个碱基对的配对，可以确定 2～10 个 MEN1 基因外显子的位置。500～1000 个碱基对和 3000～3600 个碱基对的大量配对首

先显示感兴趣的配对，但是，事实上是由查询序列和 EST 序列中 Alu 元素引起的。这些可以通过检查这些区域配对的界限和相似的 Alu 元素一样多的被标注的 EST 来决定。尽管，界限行概要包括截断的界限行，重要的是记住查看比对部分提供的完整的界限来看 Alu 标注。一个避免由 Alu 元素带来的命中序列的方法是过滤掉人类重复序列。这一选择只能在高级 BLAST 页面才可获得。

因为查询序列和目标序列都是核苷酸序列，这些数字取决于核苷酸序列位置。查询序列中的核苷酸低度复杂部分被掩藏替换为字母 n（如在第三块中的 nnnnnnn ）。BLASTN 从数据库序列中的正性链核对查询序列的正性链和负性链。比对显示查询序列的正性链到数据库序列的负性链，这等价于显示从查询序列的负性链到数据库序列的正性链。

BLASTN 是最快捷的查询，而不是最灵敏的。这种算法用一个简单的系统来评价比对。匹配上的得正分，匹配不上的得负分。BLASTN 用于想要的核苷酸序列的直接对照。BLASTN 结果不能够对编码的蛋白质做任何功能预测。总之，查询蛋白质比对更加敏感，因为有更多的符号（20 个氨基酸残基而不是 4 个核苷酸残基）而且有一些密码子是已经退化的（密码子有简并性；前两个字母相同而后一个字母不同的密码子通常编码同一种氨基酸）；使用蛋白质对照物的更复杂的记分系统同样被用来比较不同残基之间的相似性。

PSI-BLAST：位点特异迭代 BLAST

BLAST 2.0 的一个主要的新特征是迭代搜索。位点特异迭代 BLAST 先执行一种标准的 BLASTP 进程，然后使用最有效的命中序列在内部构建一个表达谱。一个表达谱可以被理解成一张列出在一个保守蛋白质区域每个位点中找出一个残基的可能性的图表。待测序列和最显著匹配序列间的保守区被用来构建表达谱。据推测，这些区域可能对蛋白质功能很重要。然后用这个加入新的命中序列的表达谱再次搜索数据库。如此以上一次迭代的结果构建的新的表达谱进行反复搜索。每一次 PSI-BLAST 迭代加入了前一次循环结果中的最显著序列（即那些低于这个表达谱所含结果阈值的序列）。PSI-BLAST 对于寻找已知蛋白进化上的“远亲”的灵敏度要比一般的 BLASTP 高很多。目前，这种迭代搜索只能有效地应用于 BLASTP 程序。

PSI-BLAST 的结果与其他程序不同。PSI-BLAST 给出了第一次位点特异迭代 BLAST 得出的 one-line 结果总结（即使用这个表达谱进行的第一次搜索）。这个结果被分成两部分，E 值高于（低于）那些用来构建表达谱的序列的结果（预定值为 0.001），以及那些 E 值更差的结果。匹配序列好于阈值而将加入表达谱的会通过验证。使用者可以验证（或者拒绝）配对序列，从而使得它们加入或不加入下一次迭代的表达谱。在前一次迭代中得到的匹配序列以一个绿点进行标记。新序列以一个黄色的“new”进行标记。当结果已经完成，页面会提醒使用者（即表达谱的结果中没有低于阈值的新序列在这次迭代中被发现）。

如果想得到在一次 PSI-BLAST 搜索中得到的一个命中序列的 E 值，就应该使用在这个表达谱的结果中低于临界值的配对序列在第一次迭代中计算的 E 值（即当命中序列被标记上“new”时）；然而，如果这个命中序列是在第一次 BLASTP 过程中得到

的，那么得出的 E 值就应该来自于这次进程。另一方面，在随后的迭代过程中，命中序列本身也被用来构建表达谱，所以得到的 E 值就不是真实值。

搜索策略

低复杂度区域的过滤

低复杂度的区域可能会误导搜索结果。包含这些区域的残基频率与这个数据库显著不同，中断了 BLAST 的统计。这会引起基于纯粹的集成位移的对齐，而不是显著的位点对齐。按照预先规定，低复杂度的序列应从待测序列中过滤出去，并且以 n（核苷酸）或 X（蛋白质）字符串替代。一次富含脯氨酸和 DNA 指导的 RNA 聚合酶（Swiss-Prot 序列号 P11414）的 BLASTP 搜索与 nr 数据库比对显示的过滤的和非过滤待测序列得到的结果是不同的。执行过滤后，得到了 24 个 E 值高于 10 的数据库比对结果；而如果不执行过滤就得到了 4872 个比对结果。

人类重复序列的过滤

待测序列中的长散布重复片段、短散布元件、逆转录病毒和其他重复元素同样会误导数据库的搜索结果。在前的 BLAST 页面包含一个用来过滤人类重复序列的检验栏。这个选项预先设定为“off”，如果人类重复序列过滤被转为“on”，左边命中序列的视图就会消失。

BLAST 结果报告

衡量一次 BLAST 对齐的重要性的最可靠指标是预期值（E 值）（数据库匹配上同一得分的预期序列的可能性的数值）。这个数值与记分系统一样用来说明待测序列的长度和数据库的容量。命中序列和最初得分都不是可靠指标，这是由于在不依赖用以计算 E 值信息的情况下无法判断其有效度。当面临数据库这种容量时即当偶然性的对齐成为可能并且使用者有可能知道哪个得分匹配会有效的时候，就是最直观的失败了（如在这个时候，EST 数据库包含约 7 亿个碱基对）。统计学意义同样在不同数据库之间不同（如一个有特定得分的命中序列可以在一个相对小的月数据库中有统计学意义，但在 nr 中却得不到），以至于可能会误报某一没有数据库容量背景的得分。同一性的百分率由于同样的原因同样是统计学意义不大；加之，实际上无法估计 E 值甚至是来自同一性百分数的得分，从而不可能猜测是否由于偶然性得到一个命中序列。

mRNA 序列分析

1. 鉴定可读框以获得蛋白质序列。在 nr 蛋白质数据库中执行提交 cDNA 序列的 BLASTX 搜索。任何命中序列都可以鉴定蛋白质序列的正确可读框并提供相关功能信息。

2. 鉴定此蛋白质序列是否与先前鉴定的蛋白质相同。在 nr 蛋白质数据库中用蛋白质序列作为待测序列执行 BLASTP 和 PSI-BLAST（迭代）搜索。

3. 确定此蛋白质序列是否与那些翻译产物不存在于 nr 中的非特性化 DNA 序列的

翻译产物相同。在 EST、STS、GSS 和 HTGS 数据库中执行 TBLASTN 搜索。

4. 在初次搜索后，在核苷酸和蛋白质月数据库中每月执行一次搜索以提供新近增加序列的信息。一次在月蛋白质数据库中的 BLASTP 搜索将揭示新近的特征蛋白序列。一次在月核苷酸数据库中的 TBLASTN 搜索将揭示 nr、EST、HTGS、STS 和 GSS 中新的可读框。在 nr 中的 PSI-BLAST 搜索同样应该偶尔执行，因为表达谱中新增的新序列会依次帮助鉴定亲缘关系更远的相关序列。

5. 如果此蛋白质序列包含复杂的功能区域，那么就应该在这些区域中依次执行各个搜索。

基因组 DNA 序列分析

1. 鉴定潜在的转录片段。在 EST 数据库的 DNA 序列中执行一次提交核苷酸序列的 BLASTN 搜索以确定 mRNA 是否来自于基因组序列。EST 命中序列会显示外显子的特定区域。一次 nr 中的 BLASTN 搜索可以鉴定转录物或先前的特征性基因组片段。

2. 鉴定潜在的可读框。在 nr 蛋白质数据库中执行一次 BLASTX 搜索。命中序列可以鉴定蛋白质序列的正确可读框并提供功能相关的信息。如果以前述方法未找到结果，就可以在 EST、GSS、HTGS 和 STS 中执行 TBLASTX 搜索（翻译核苷酸待测序列与一个翻译核苷酸数据库进行比较）来鉴定其他可读框。

3. 经过初次搜索后，在核苷酸（通过 BLASTN）和蛋白质（通过 BLASTX）序列数据库中每月进行一次搜索能得到新近增加序列的相关信息。

4. 潜在的转录序列能够作为 mRNA 序列的上游指示进行分析。

搜索短序列

短序列只能引起短对齐。这些短对齐需要有相对强（即有高百分比的匹配残基）的在本底噪声之上增加的能力。短而强的对齐使用高的相关熵的矩阵比使用预先规定的 BLOSUM-62 更易被检测到。相关熵主要是每个位点的平均有用信息以区别于偶然的对齐。BLOSUM 矩阵不包括适宜于短的待测序列的搜索，所以推荐使用 PAM 矩阵以代替。这些矩阵可以从前面的 BLAST 页面上的菜单里选择。不同搜索长度的建议矩阵在表 6.3.2 中已列出（S. P. Altschul，pers. comm.）。

表 6.3.2　短序列的取代矩阵

搜索长度（氨基酸）	矩阵
＜35	PAM-30
35～50	PAM-70
50～85	BLOSUM-80
＞85	BLOSUM-62

序列对比算法

配对序列对齐有两种形式：整体的和局部的。整体策略试图沿着整个序列的长度进行排列，而局部对齐越过更短的区域集中于序列相似处进行排列。启发式的算法是允许

在一个合理的时期内与整个数据库进行对比的一个捷径。在它并不探究可能性的意义上这不是彻底的搜索，这看来似乎不大有趣。有些程序允许使用者调整参数来增加搜索的灵敏度（即探究更多的可能性），但这必须与更慢的搜索速度并行。有研究表明预先设定好的启发式算法是彻底搜索的途径。BLAST 和 FASTA 是两种使用普遍的启发式程序。接下来的论述将集中于 BLAST 的最新版本 2.0。

BLAST 对它得到的每一个对齐都有统计学意义。显著性意义以 *E* 值来表达，即数据库匹配上同一得分的预期序列的可能性的数值（分数的算法将在下文描述）。*E* 值依赖于数据库的容量和待测序列的长度，因为随着这些参数的增加匹配数也可能增加。*E* 值的算法基于 Karlin-Altschul 统计学方法（Karlin and Altschul，1990，1993）。

一次对齐的最初得分通过记分系统进行计算，这是一个残基替代分数的图表，代表一个空位的存在和延伸。对于标准的蛋白质对照，一个矩阵（即残基替代分数的图表）提供了两个氨基酸的每一个可能对齐的得分，而 L 与 I 的对齐得到一个负分。BLOSUM-62 是预先规定的矩阵，试验表明它检测弱蛋白质相似性是最好的。PSI-BLAST 使用一个列出在保守蛋白质区域特异位点找到特定残基的频率的图表。这个图表通过从来自数据库的最佳匹配的每一次迭代的“on the fly”计算得到。BLASTN 使用一种简单的设计即匹配得到正分而不匹配得到负分。当一个序列比另一个长一个特定区域时，空位是开放的或延伸的。BLAST 使用分数 a 来表示一个空位的存在，以 b 来表示一个空位里的每一个字母，以至于一个空位的长度以字母 k 来得到一（$a+bk$）。这种形式得到的空位被认为是远交的空位值。这些空位值可以由使用者更改。记分系统确定一次对齐的最初得分。一些分数能够利用最初分数通过以下公式计算得到：

$$S_{bit}=[\lambda \times S_{raw}-\ln(K)]/\ln(2)$$

Karlin-Altschul 参数里的 λ 和 K 依赖于记分系统。得到的（二进制）位分符合统计学意义依赖于使用的记分系统。这使得从两个不同 BLAST 进程得到的（二进制）位分数可以相互比较，每一次执行使用不同矩阵或空位延伸和存在值。然而，使用 *E* 值比使用（二进制）位分数来比较不同 BLAST 进程的结果更有意义，因为 *E* 值涉及数据库的容量。

一种基于代码的方法被用来在 BLAST 中搜索匹配。一次通过 BLASTN 的非空位搜索可以用来表示一个代码的概念。首先列出一张由特定长度（被称作代码长度）的核苷酸待测序列中的所有序列组成的表单，并且记录其位点。然后扫描数据库，搜索目录上的代码。如果在一个待测序列和一个数据库代码之间找到了一个匹配，对齐则延伸（不允许空位）直至相应的分数达到一定低于极限结果的数量，指出使用的最大极限的分数（以及相应得对齐）。这种对齐区域是局部（序列）对比。使用 BLASTN，只有精确的匹配能够延伸且预定代码长度是 11bp。

这种操作进程比其他程序（BLASTP、BLASTX、TBLASTN 和 TBLASTX）更复杂。精确的代码匹配不是必需的，并且预定代码长度是三个残基。一个待测序列代码和一个数据库代码之间的匹配基于记分矩阵，即指定是否两个残基导致一个正的、负的或中性的匹配。如果一个待测序列中的三个残基代码通过一个数据库序列中的三个残基相比较，并且得分高于一定阈值，那么这个代码支付命令就要进一步进行考虑了。在 BLASTN 的描述中提到，BLAST 2.0 的缺省进程是两个代码（位于待测序列）必须与

两个代码（位于数据库序列）于匹配延伸前在一个 40 个残基的窗口内相匹配。找出两个代码匹配的效用是消除随机匹配，以提高对于三因素 BLAST 的速度。

在 BLAST 中，非空位对齐被用作空位对齐的起始位点。有 11 个最高得分的字母被确定并且中心字母被用作比对中出现的空隙的开始。这些序列被延伸时允许空缺的存在；如果发现空缺比现今出现的最大空缺还要大，那么使用最大值。

预先设定的 BLAST 参数是速度和灵敏度的平衡，因此可能有重要的比对会丢失，尤其是在检索小的数据库时。在这种情况下，建议在其他的程序中使用 BLASTN 更短的字段或更低的阈值。

记住 BLAST 预测的相似性是很重要的。进化关系的同源性必须通过进一步的分析来证明。

参考文献：Zhang and Madden，1997；Zhang *et al.*，1998

编　　者：Tyra G. Wolfsberg and Thomas L. Madden

附录 A：BLAST 参数

最新的 BLAST 页面使得更改 BLAST 的参数成为可能。在下面列举了最重要的选择。

物种（下拉菜单）　通过物种来进行检索的限制。下拉菜单提供了一系列最普通的物种，其他的可以在文本框内输入。

期望值（下拉菜单）　又被称为 *E* 值，是报告比对中重要的数据阈值。预先设定的值是 10。根据 Karlin 和 Altschul 推测的模型，10 个序列被发现的机会是很小的，更低的期望值会更严格，导致发现更低的配对机会。因此微小的值是可以接受的。

过滤（检测框）　揭示那些有低的位置复杂性和那些包括人类重复的查询序列片段。位置复杂性由 SEG 程序来决定，而 BLASTN 则由 DUST 程序决定。过滤仅应用于那些有疑问的序列（或其转录产物），而不是数据序列。通过预先设定，在最终的 BLAST 报告中一个过滤的序列代表了一串为 n 的核苷酸序列或 X 的蛋白质序列。在最新的 BLAST 页面，可以仅在查找框内选择掩盖低的位置复杂性和那些人类重复序列。当该框检验后仅在 BLAST 检索的最初阶段这些序列会被掩盖，并且在 BLAST 报告中不会被 n 或 X 代替。

遗传密码（下拉菜单）　在查询 BLASTX 的翻译中可以选择遗传密码。预先设定的是通用密码。密码的选择由查询序列的来源（如特异性物种、线粒体）决定。

基质（菜单）　在 BLOSUM-62 的预先设定中可以对基质进行改变。这在短序列的检索中很有用（参看短序列的检索）。也可以改变缺口的存在和结果的扩展。但是我们建议用给定的基质进行预先设定。

图谱总览（检测框）　显示与查询序列对齐的整个数据序列。一个序列的得分由 5 种不同颜色中的一种来显示，而这 5 种颜色将分数分成 5 个等级。如果有 1 个以上的序列在数据序列中展示，那么这两个序列通过有阴影交叉线条来连接。将光标放置到比对上会在窗口上方显示定义和分数。点击条将用户带到相关联的序列。总览是预先设定的。

说明（下拉菜单）　限制单行描述的数量到指定的数量。预先设定的值是 100。

校直（下拉菜单）　限制显示序列的命中数据库的数量。一些序列有可能与一个数据库序列相关联，所以序列的数目可能实际上比这个数值大。预先设定的值是 50。

附录 B：序列标识符的排序

通过 NCBI BLAST 服务器进行序列标题的有序排列依赖于每个序列均被获得的数据库。表 6.3.3 列举了序列来源数据库的鉴定，如一个标识符可能是 gb | M73307 | AGMA13GT，标签 gb 意味着是 GenBank 序列的标识符，M73307 是 GenBank 的登录号，AGMA13GT 是其在 GenBank 中的位置。

表 6.3.3　序列数据库的标识符排序

数据库	分类学 ID[a]
GenBank	gb | accession | locus
EMBL Data Library	emb | accession | locus
DDBJ（DNA Database of Japan）	dbj | accession | locus
NBRF PIR	pir ‖ entry
Protein Research Foundation	prf ‖ name
SWISS-PROT	sp | accession | entry name
Brookhaven Protein Data Bank	pdb | entry | chain
Patents	pat | country | number
GenInfo Backbone Id	bbs | number
General database identifier	gnl | database | identifier
NCBI Reference Sequence	ref | accession | locus

a. 条框“|”分隔不同的区域，在一些情况下，即使最初的规范要求包含这个区域，该区域也要是左空格。为了使这些标识符能与以前的分析器反向相容，空白区域要用额外的条框（“‖”）来指示。

NCBI 将包含在 NCBI 序列数据库中的所有序列都指定 gi 标识符。gi 标识符提供一个独特和稳定的命名转换，而在这个命名转换中每个特殊的序列都有其独特的 gi 标识符，如果一个核苷酸或蛋白质的序列发生改变，一个新的 gi 标识符会被命名。但其记录的登录号保持不变。因此，gi 标识符提供一个确定在给定的检索中能获得其真实序列的机制。

在 nr 蛋白质数据库检索中 gi 结构是 gi | gi _ identifier，而该蛋白质数据库的序列来源于核苷酸数据库中序列的概念上的翻译。一个例子是 gi | 451623（U04987）env [Simian immunodeficiency…] 451623 是 gi 标识符，U04987 是其来源的核酸序列的登录号。

使用者可以在 BLAST 输出中选择 gi，而这会产生一个更高的有 gi 标识符的标题行，该 gi 标识符能连接到其来源的数据标识符的数据库。例如，gi | 176485 | gb | M73307 | AGMA13GT 可以在核酸数据库中用来进行比对，gi | 129295 | sp | P01013 | OVAX _ CHICK 可以在蛋白质数据库中进行比对。

在整个标识符中，没有列入表 6.3.3 的数据库允许用相同的结构进行标识，这里有

一个例子是一般标识符 gnl | PID | e1632。PID 表示蛋白质的 ID，“e1632” 中的 e 表示这个 ID 号是由 EMBL 发行的。正如上文提到的，gi 选择的应用产生了 NCBIgi（除了 PID 之外），因此用户也可以用它来获得感兴趣的序列。

单元 6.4　人类基因组的获取

如今，我们已经可以获得人类基因组的大部分序列。无论研究者的兴趣范围是什么，他们都希望使用某些方面的数据，然而，如果要很好地运用它，这里仍然存在着一些问题。

1. 存在有>4Gb 的原始序列数据。
2. 已完成的草图数据质量参差不齐。
3. 序列和图谱数据都会频繁更新。
4. 许多小组都提供了数据的观点，而且每种都是半独立生成的。
5. 有各种各样的图谱调节系统。
6. 有很多数据类型，包括基因功能和表型信息。

数据的复杂性不仅给负责数据资源公共使用小组，而且也包括使用这些资源的用户带来了挑战。提供者必须确定适当的流程来跟踪、分析和整合双方的信息以易于使用，从而满足科学家们各种各样的研究兴趣。研究界认为，利用这种信息需要熟悉相关复杂性和可能受到日期的限制，以便能够有效地利用不同的网站提交日期。

由于网站动态变化的性质，在这里提供的一些信息有可能变化很快，因此尽管作者提供了一些程序和网站的整体总览，但是更多最近的信息可能在个别网站（表 6.4.1 有用的网络地址和 FTP 网站）中获得为了有助于理解这里提到的一些专用名词，请查询以下术语。

表 6.4.1　常用网址

网站	URL 地址
UCSC Genome Browser	http://genome.ucsc.edu
Sequencing Information	
Celera Genomics	http://www.celera.com
Analysis Tools	
BLAT	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start
BLAST	http://www./ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
E-PCR	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/sts/epcr.cgi
RepeatMasker	http://repeatmasker.genome.washington.edu
Sim4(mRNA to genomic alignment tool)	http://globin.cse.psu.edu
Spidey(mRNA to genomic aligmment tool)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey
SSAHA	http://www.sanger.ac.uk/Software/analysis/SSAHA
Maps	
BAC FingerPrint Map	http://genome.wustl.edu

续表

网站	URL 地址
Other Annotation Sources and viewers	
Celera Genomics	http://www.celera.com
DAS	http://www.biodas.org
The Genome Channel	http://compbio.ornl.gov/channel
Incyte Genomics	http://www.incyte.com
FTP sites	
Ensembl	ftp://ftp.ensembl.org/pub/current_human/data
NCBI	ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/H_sapiens

BAC（酵母人工染色体）　在人类基因组计划中常用的克隆类型。BAC载体能够承载大的插入片段，一般80～200kb，在大肠杆菌中作为一个单拷贝的附加体增殖。

BLAST（基本序列检索工具）　展示序列对比的一种方法，可用于蛋白质序列或核苷酸序列。

BLAT　允许在大规模基因组序列进行检索的散列法规。同样允许通过接合位点信息对精确的转录后序列进行快速检索。

ePCR（电子PCR）　在引物对存在的情况下检索给定序列的程序。这些引物必须有合适的定位、距限定的比对有段指定的距离。

ExoFish　这项技术采用全基因组鸟枪（WGS）从pufferfish、tetraodan nigroviridis中读取，并将它们与人类基因组对齐来解释序列转换中的基因。

Fingerprint　当用特殊的酶，如*Hind*Ⅲ进行处理时一个克隆产生的条带类型。

FISH（荧光原位杂交）　在这个例子中，细菌人工染色体的克隆是被荧光标记的，并且杂交到染色体的伸展区。用这种方法一个克隆能够显示单个细胞遗传条带。

Gi　在GenBank/EMBL/DDBJ中用gi来特异确定信息库中一个序列的特殊情况。

LocusID　特异鉴定者能够用来显示所有的转录物蛋白质和给定区域的模板。

RH（放射性杂交）图谱　一种物理图谱方法，能够估计与放射性诱导的染色体断裂相关的连接和距离。类同于减数分裂图谱。

序列检索法则　又被称为散列法则（如BLAT、SSAHA）。这意味着该程序将基因组分为限定的词组，一般为10～12个字母。这些词组根据它们的位置而被编入索引并储存起来。该类法则允许对基因组进行快速检索。但是该速度的结果具有灵敏度的缺失，然而，散列法则在高相关DNA的DNA显示检索中很有用，当用更不相同的序列进行显示检索时最好用更慢的但更灵敏的BLAST检索。

SNP（单核苷酸多态性）　当对两个个体进行相同序列的比较时，经常会有单个碱基对的变化，这些都是有用的遗传标记。

SSAHA　用于大规模基因序列检索而发展的散列法则。

SSLP　单个序列长度多态性。

STS　序列标签位点，大约是一些短的（200～500bp）序列。利用寡核苷酸引物可对这些序列进行PCR扩增，电泳分析后能够产生单个条带。

WGS（全基因组鸟枪法）是将整个基因组切成分离的大片段（一般 2kb、10kb、50kb 和 150kb）并将其克隆到合适载体的一种方法。这些克隆的末端是被测定的。来源相同的克隆其两端是可以配对的，如果容量大小已知，那么两个配对的距离能够推断出，但会有一点偏差。

数据的性能

输入

两种方法已被用于人类基因组的测序。一个商业公司——Celera 基因组（http://www.celera.com），利用全基因组鸟枪法测序。这是一个测定在信息库中的已插入不同片段大小的克隆两端序列的非等级方法。这个序列数据库和排列仅能被注册者使用，在这并不对它介绍。而政府支持的人类基因组测序则利用建立在测量单个克隆序列的等级方法上。再在序列重叠处确定序列和克隆的图谱位置。

只要重叠群大于 2kb，政府资助的测序中心就需要将其数据从依赖克隆的测序计划放置到公众数据库上。通过大规模中心提交的序列包括描述序列等级的关键词，这些关键词支持利用词组进行的特殊记录类型（包括已完成的不同阶段的草图）的检索。测序中心也提交与每一个碱基相关的质量等级，在获得序列片段的可靠性中该信息是非常有用的。表 6.4.2 高通量基因测序的关键词。

表 6.4.2 高通量基因组序列关键词

0 期	小量覆盖过 1 个克隆，通常只要 1 次覆盖
1 期	4～10 次覆盖 1 个 BAC 克隆，确定未知片段的顺序和方向
2 期	4～10 次覆盖过 1 个 BAC 克隆，得到已知片段的顺序和方向
3 期	完全完成的序列
HTGS 草稿期	一项草稿计划，收录 1 期或 2 期计划中超过了特定质量标准序列，通常，这些转录体是高质量碱基 BAC 克隆的 3～4 倍覆盖
HTGS_ fulltop	用来收录负责完成某克隆的中心加入它们所完成的序列在初期得到的足够的新鸟枪测序法覆盖序列
HTGS_ activefin	用来收录负责完成的中心实际开始完成序列的起点
取消的 HTGS	用来收录那些从未被实际完成的序列。克隆因为多种原因一直未能完成

提交序列都会给定一个许可号、版本号和 gi 号。当提交一个更新序列时，它的版本号和 gi 号都会改变（提供版本增量和新的唯一的 gi 号）。但是，许可号是登记序列的一个稳定的标识符，而且可以一直检索到当前最新的记录。许可号、版本号和 gi 号三者自身的组合就可以提供一个序列鉴定，如同它同时存在一个特定位点。

草图序列是以无序的无确定方位的由未知长度的空隙所分割开的碎片所第一次提交的。到达一个完整的状态之前这些序列记录会被更新许多次。序列的最新资料改变相当大，包括合并碎片、新序列、损坏或重复序列的缺失或分离碎片这些重要的改变。另外，如果发现一个重要问题（如克隆重排），许可号可以由测序中心完全独立出来。污染物（如大肠杆菌、噬菌体或其他原生动物的 DNA）可能有不小心以特殊的克隆或由

于实验室错误（培养基或试管标签错误）、测序的错误（泳道示踪）或者相关数据库的错误鉴定，这些错误都会被提交上来。由于这些错误的检出，它们会从后续的数据更新中被清除。因此，当用到序列数据库时，应该谨慎地注意登录序列的许可号、版本号(或 gi 号)。如果数据改变，先前的版本会被补充或用来鉴定差异。

序列拼接

理想状态下，人类基因组序列会得到一条精巧的染色体，但是，在人类染色体组序列完全测序之前这是不可能的。确实，尽管 20、21、22 号染色体都已经完全测序，但还是保留了序列空白，由于当前克隆和测序技术的限制，超过 95%的人类基因组已经以完整或草图序列的混合形式存在，因此当前人们有相当数量的信息可供利用。但是，使用这些数据库的原始提交形式还会受到几种因素的妨碍。

1. 数据库容量。
2. 草图序列包括未知秩序形式的碎片。
3. 重复投稿。
4. 一些矛盾或有偏颇的注释。

汇编软件有几个有效的好处。汇编减少了重复而且能够消除许多克隆错误，如序列污染或不恰当的注释。特别应当注意的是，汇编序列增加了连续序列全长基因组的相似性，是一个十分引人注意的进步。

目前，NCBI（美国国立卫生研究院）提供了完全公开免费的全长基因组数据库，公布在 NCBI 和 UCSC（加州大学圣克鲁兹分校）和以下将要介绍的总体资源的网站平台上。但是，一年多过去了，只出现了两种汇编软件。一个由 UCSC 制造并用于他们自己网站的浏览器上；另外一个由 NCBI 制造公示于 NCBI 的 Map View 上。图 6.4.1 说明了 NCBI 一般的汇编软件和注释的流程。

当评估一个基因组汇编的有效性时，用户应该清楚地了解在处理汇编克隆序列时存在几个复杂因素，其包括如下内容。

1. 克隆谱错误。
2. 大部分片段是无序无方向的。
3. 有许多小而分散的重复元件。
4. 很多大片段重复序列。
5. 大和小的多态。

由于存在以上问题，很难把这些克隆组装成一个参考序列。一个促进序列比较的方法是把克隆分离为已经定义好的小块。很明显，早期的组装尝试生产出了很多不同产品。然而高启发的限制，加上许多完成的序列和引入 clone tiling path 的信息，最终导致两种方法合并为现在的一种装配方法。clone tiling path 由染色体编辑技术提供支持，基于多种实验绘图技术。质控检查、人工回顾、在 NCBI、UCSC 和 Ensembl 经常沟通，以及染色体编辑都进一步改进了接下来的组装技术。

可能发现两种独立装配技术或者同组超时的不同。这是因为在不同的时间组装，而基因测序中心每天都更新序列信息，所以导致了这些不同。为了对不同组装方法进行有意义的比较，必须使用特殊的序列。一般而言，即使基因测序中心更新了序列信息，也

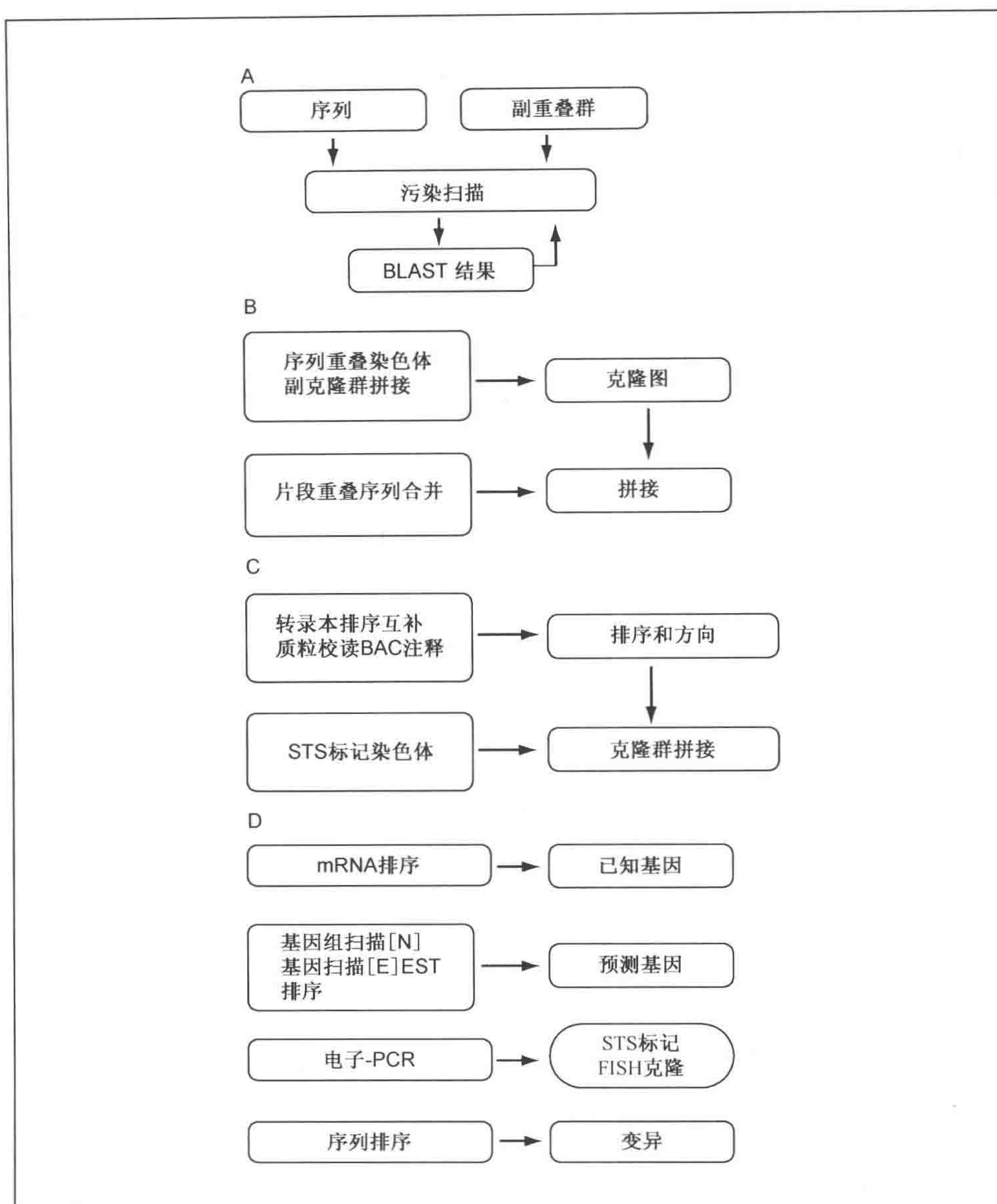


图 6.4.1　基因组组合和注释流程。A. 冻结算法。在一个特定的系统日期里，会产生一系列 gi 号码，代表着在那一天的 HTG 序列快照。手头的命中序列重叠群代表着已完成序列也冻结了。这些序列由于污染而部分屏蔽。序列结果被用来产生一系列用 HTG 序列代表的 BLAST 结果的命中序列。B. 重叠群组合算法。利用重叠和映射信息，一个克隆蓝图会被组合出来。来自这些克隆的序列会被归并到重叠而产生的组合重叠群序列。组合信息可以被用来把重叠群变成构架。C. 重叠群配置步骤。排列法被用来使组合碎片有次序和确定方位。STS 信息用于沿着染色体安置和确定重叠群的位置。D. 注释步骤。计算机特征（右列）通过排列和计算机方法（左列）注释在组合序列上。

不会对这些特殊序列产生影响。

注释

基因注释代表了序列的位置以及重复序列、cpG 岛、基因、变异、其他标记和编码蛋白质的结合区域或者结构基序。很大一部分基因能够通过人类染色体的自动注释定位一般基因的特征。

公众以及商业机构都对基因注释做出了很大贡献，包括 DAS、the Genome Channel、the Ucsc Genome Browser 及 NCBI Map Viewer。

注释的特征

Ensembl、the Ucsc Genome Browser 及 NCBI Map Viewer 都是自动对各种特征归类。Ensembl 和 NCBI 已经开始发展内部注释通道。UCSC 的很大一部分数据来自合作的个体，UCSC 和 Ensembl 也互相交换很多数据。

三个网站的注释原则有很多都是一致的。RepeatMasker 是用来鉴定散在染色体上的重复元件，STS 则用 e-PCR 程序定位序列。另外，UCSC 和 Ensembl 用 BLAT 对许多来自 STS 的序列进行定位。定位染色体的 STS 对整合序列信息很关键。利用其他的非基于序列的基因绘图，如 genetic 和 RH，许多基因特征，如 SNP、ESt、mRNA、小鼠 WGS 可读框和基因克隆，都能通过 BLAST、BLAT、SSAHA 这一类的标准 DNA 测序软件定位。通过对克隆进行原位荧光分析排序，可以整合细胞水平的数据。整合非序列绘图数据提供了一个强有力的方法去研究基于标记或细胞数据的相关序列。

用整合的方法鉴定已知基因可以提供很多上下序列的基因标记和功能信息，反过来也很容易研究丰富的基因和蛋白质编码信息，包括 publications、OMIM、RefSeq、SWISS-PORT 和 LocusLink。人类基因测序潜在的目的就是为了寻找新的基因。基因注释的质量也可以评价一种方法的好坏，如信噪比、衔接部位的重复区域、假基因、基因家族、衔接转移、测序错误、组装错误，以及 mRNA 序列错误。

这些问题使检测染色体非正常区域的已知基因和准确鉴定异常基因变得极其困难。

基因模式的不同造成了基因注释方法的很大差别。进行基因注释，三组用了不同的方式和不同的归类和预测程序。一般而言，用这些不同的方式和不同点的预测程序对 mRNA、蛋白质进行分类。基因注释的结果常常称为模式，因为它们来自很大的群体且代表了一个时期基因序列信息。基因模式也有相应的转录和蛋白质模式。有时候单个基因有很多种转录和蛋白质模式。

UCSC 基因模式

UCSC 不直接产生基因模式、分配鉴定或者追踪基因，但是 UCSC 提供了很多潜在的支持。所有 mRNA 和 EST 都必须依靠基因组的信息。EST 的衔接信息则是通过辨别 EST，并不需要这类信息。进一步说，多种基因预测程序的结果输出以及基因组额外的特性都是依靠合作者和 UCSC Genome Browser。

Ensembl 基因模式

Ensembl 用分级的方法来检测基因模式，首先利用了很多可靠的信息，然后得出可靠的模式信息。这些模式是基于蛋白质分类而不是核酸分类。基因扫描常用于制造基因模板，这样的区域不会产生蛋白质衍生物（Burge and Karlin，1997）。一旦所有的基因模板完成，这个蛋白质序列就会被看作是生产人类蛋白质不可或缺的组分。Ensembl 也使用人类治疗去改善基因模板。模板也提供了一种独特的识别方式使查找数据非常方便。

NCBI 基因模板

NCBI 采用一种分级的方法来制备基因模板，但是它主要依赖核酸校对而不是蛋白质校对。它们的目标是从更多的水平上为基因模板提供证据，从具有代表性的已知基因到完全预测的基因模板。一个成果需要有力的信息，这种信息可以通过参考序列记录的繁殖特征获得，也可以通过核酸链的方式获得。那些已完成的序列中很难使用自动链方式来注解特别是决定相关基因家族的区域就常常要求用手工的方式输入参考序列记录中（表 6.4.3）。参考序列记录提供了自动注解功能。参考序列和 mRNA 基因库通过汇编的基因组序列将大部分已知基因及它们相对应的 mRNA 和蛋白质联系起来。当来源于现成的序列数据库的不同模板在同一段 RNA 上具有一个或更多相同的外显子或内含子的时候，它们往往被编入同一基因组。如果 mRNA 序列在基因组中有不止一个特定位点，那么用基因重叠群的方式来校对就是最佳选择。如果校对仍然不能识别，那么制备这些基因模板的时候就要包括特殊位点和另外一个不同的识别位点。基因模板是根据表达序列标签和 mRNA 来预测的。当所有的检验结合在一起能够提供足够的证据时，就表明这些基因模板来源于同一段基因。此外，基因的预测也可能来源于基因扫描，基因扫描是利用基因预测和同源评估的方式联合进行预测的一种方式。基因组的序列现在普遍认为它还只是基因边界的一个部分，它是建立在 mRNA 的参考序列和链式基因模型的基础上的。基因扫描并不是对链式模板的重复，它指出了一些添加物的量和两种体系的差别。基因重叠群注解指出当基因组和抄本序列之间存在最小差异（即错配＜4，校正长度＞90％参考序列长度，小沟＜3）时，就存在一个参考序列记录（NM-添加物首字母）。然而，要自动找到连接的 mRNA 片段和基因组序列之间的不同是比较困难的，NCBI 提供了不同的添加方式的记录（表 6.4.3），它们代表了预测的 mRNA 和蛋白质序列。这些序列与基因组序列一致，除非改变的序列使 mRNA 和表达序列标签的可读框发生改变。一旦这样，蛋白质序列就会调整到与相应的 mRNA 数据一致的方式进行蛋白质生产。这样，mRNA 或蛋白质序列就可能影响基因组序列中的不同序列，也可能是第一个不确定的基因。模型能通过已知基因之间的联系而被追踪。当一个模型与一个已知基因一致时，它就与一个先前存在的位点联系起来。当基因家族中存在一些功能不明确的片段或一些不同的信号序列的时候，那么重新指定新的连接位点。NCBI 的参考序列工作人员就是要解决这些模棱两可的结论。

表 6.4.3　进入格式

接入号	序列类型	FTP 地址
NCBI 进入格式		
NC_123456	染色体	ftp://ncbi.nlm.nih.gov/genomes
NT_123456	基因组重叠群	ftp://ncbi.nlm.nih.gov/genomes/H_sapiens
XM_123456	mRNA,模式	ftp://ncbi.nlm.nih.gov/genomes/H_sapiens/RNA
XP_123456	蛋白质,模式	ftp://ncbi.nlm.nih.gov/genomes/H_sapiens/protein
XR_123456	未翻译 RNA,模式	ftp://ncbi.nlm.nih.gov/genomes/H_sapiens/RNA
NG_123456	基因组区域(副)	ftp://ncbi.nlm.nih.gov/refseq
NM_123456	mRNA,已知基因	ftp://ncbi.nlm.nih.gov/refseq
NP_123456	蛋白质,已知基因	ftp://ncbi.nim.nih.gov/refseq
Ensembl 进入格式		
ENSG0000XXXX	基因	ftp://ftp.ensembl.org/pub/current/data/fasta/cdna
ENST0000XXXX	基因转录体	ftp://ftp.ensembl.org/pub/current_human/data/fasta/cdna

进入数据库

这三个地址在使用的项目和服务（表 6.4.4）上有很大的相似性，尽管如此，它们还是采用了不同的系统，使用者为了解决问题或浏览必须要了解怎么才能获得这样的信息。这样，尽管三个地址都提供了计算机支持系统、显示和数据下载，但是它们在具体的特点上有较大的差异。

表 6.4.4　多种浏览器提供的注解

特征	UCSC 基因组浏览器	Ensembl	NCBI
STS	STS Marker	Marker	STS (Mb). Radiation Hybrid (cRay), Genetic(cM), Whitehead-YAC Map(ordinal)
Gene	Ensembl genes, Fgenesh ++ genes, full mRNA, and known gene	GenScan models, mRNA alignments, and transcript	Genes_Cytogenetic(cM), Genes_Sequence(Mb), GScan(Mb; prediction), and RNA(Mb)
Cytogenetic	Cytogenetic band	Cyto View	Ideogram(cytogenetic band), FISH Clone (cytogenetic bands), and Mitelman Breakpoint (cytogenetic bands)
EST	EST and spliced EST	EST Alignment	UniGene(Mb)
SNP	Overlap SNP and random SNP	SNP	Variation(Mb)

续表

特征	UCSC 基因组浏览器	Ensembl	NCBI
BAC clone	Coverage, FPC Contig, and Tiling Pathm	Tiling Path	GenBank Map(Mb)
Phenotype	NA	NA	Morbid (cytogenetic bands)
GC content	GC percent	GC content	NA
Repeat	RepeatMasker and simple Repeat	Repeat	NA
Mouse WGS read	MouseBLAT and Exonerate	mouse traces	NA
RNA gene	RNA gene	tRNA	NA
CpG Island	NA	CpG Island	NA
Sequence Assembly	Assembly and gaps	Contig	Contigs(Mb)
Mouse Conserved Synteny	Mouse conserved synteny	NA	Separate Web site[b]
Tetraodon WGS	ExoFish	NA	NA
User Defined Annotation	Add user-defined tracks	DAS	Third party annotation

缩写词:cM,厘摩;Mb,兆碱基对;NA,不适当。见 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Homology。

知道数据库的可用性和它的代表性是进入这些数据库的关键所在。Ensembl 和 UCSC 都集中在显示特点上。显示方式已经采用核酸坐标和使用方便的显示图谱,这种图谱提供了很多水平的线索能够与序列联系起来。NCBI 的显示特点是它不仅提供了序列和非序列坐标,而且它的图谱提供了很多纵向信息。例如,STS 的特点可以在序列图(核酸坐标)、辐射状混合图(cRay 坐标)和基因图谱(厘摩坐标)中得到。这种把各种体系的坐标都呈现在使用者面前的方式使图谱更加清晰。

把序列和非序列数据整合在一起的结构图谱是一项非常艰难的工作,因为它和那些单独的图谱有很大的不同。然而,这种整合又是十分有用的,它使得像表现型这样的一些特点直接表现在基因序列中。必须要记住的是,对于 UCSC 和 Ensemble 来说,它们的特点是可通过特殊的线索而获得有用的信息,对于 NCBI,它的特点是通过一个特殊的图谱。表 6.4.5 显示了在不同地址怎么样获得和鉴别信息的特点,如在 NCBI,特殊图谱的坐标就显示在一条弧线中。同样多重参考图谱也显示了它们的种类名称(如辐射状混合图谱)。

表 6.4.5 每个网站提供的服务

服务	UCSC	Ensembl	NCBI
查询			
通过基因组上的位置	+	+	+
通过核苷酸查询(比对)	+	+	+
通过蛋白质查询(比对)	+	+	+
文本	+	+	+
文本,高级	−	+	+

续表

服务	UCSC	Ensembl	NCBI
显示日期			
注释特征序列	—	+	+
拼接序列	+	+	+
图形表	+	+	+
列表	—	+	+
下载			
区域的其他图谱数据	—	—	+
序列区域	+	+	+
上传客户图表	+	+	—
改变显示参数			
增加/去除轨道/图	+	+	+
改变轨道/图的顺序	—	—	+
跳跃到不同染色体	+	+	+
延染色体滚动	+	+	+
刻度条（标尺）	+	+	+
在具体坐标下查看	+	+	+
放大	+	+	+
FTP 下载			
拼接序列	+	+	+
图谱定位非顺序碱基	—	—	+
图谱位置基于序列	+	+	+
模式 mRNA 序列	—	+	+
模式蛋白序列	—	+	+
链接			
常见问题与答案	+	+	+
帮助文件	—	+	+
跳跃到其他浏览器地址	to Ensembl	to UCSC	—[a]
统计	+	+	+
查看之前的版本	+	—	—

a. 至 UCSC 和 Ensembl 浏览器的链接由 LocusLink 提供。

这里讨论的三个地址也有很多共同的特征。表 6.4.5 就把各种能简单索引的特点进行了详细分解。

UCSC

这个浏览器就是建立在能够简单进入整合的人类基因组的想法之上的。在这个地址上的可用信息都显示在基因的各个项目里。

Genome 浏览器一个独特的方面是容易接收染色体聚合前的模型。另外，由一个程序提供两个基因座的同位转化。这些益处归于 UCSC 浏览器所接收到的基因信息。因为大量的信息收集广泛，所以导致对信息不能快速进行最新组合。此外，这个特点使得

允许用户可直观地看到基因组模型的改变。

基于文本的查询在 Genome Browser 进行检票直接而且直观，在 Genome Brower 主页上写着“基因组浏览”的文本框内输入查询条件即可进行查询，基于文本的查询可以使用一系列不同的主题词，如基因名称、发布号码、作者名字或者基因家族名称。每一个词的查询是单独设计的。对于一个简单词，任何一个数据项目中既包含了本词，又对其进行了子串匹配的考虑。当查询内容复杂多重化时，仅返回关键内容。然而，浏览器不允许查询范围、标题、基本查询过于复杂。就是说，当查询总体染色体组中的锌元素时，就不能再具体指定查 19 号染色体的锌元素。

结果　许多查寻不只返回一个结果。在染色体浏览程序中结果的格式取决于一个实体或多个实体是否返回查寻结果。返回一个结果的查寻将直接在染色体浏览程序中显示图像。当查寻返回多个结果时，结果以列表形式返回。该列表中的项目将超链接于图像显示。图像显示时查寻范围并不以任何形式着重强调。例如，用户要查寻某一特定的输入编号，为了核查所用的查寻范围，该输入列表不得不手动地去查看。

定位查寻

利用同样的查寻，用户可以跳转到染色体组中一个特殊位置。定位查寻基于互补配对碱基对、细胞遗传学相配物或特殊的标记物。用户也可以通过按染色体数分类跳转到一段特异性的碱基对排列，即该排列的关系。一条细胞遗传学基因谱带详细说明了一次探索，尽管如此，对于细胞遗传学基因范围的查寻现在并不能得以支持。基因定位转化成碱基对位置，用户将该排列发送到浏览程序中心。为了执行一个标记的问题，一个独立的标记物被使用，浏览程序集中于该标记物上。因此，范围查询不能因为细胞遗传学基因定位问题或基于标记物定位问题而被执行。

结果　经由它们这些性质，定位查寻应该只有一个结果。在染色体组浏览程序中，定位查寻将自动向用户显示染色组图解。

序列查寻

序列比较可通过使用 BLAT 程序进行核苷酸或蛋白质查寻而执行。记录的基因组对于研究很有用。查寻项有 DNA、蛋白质、被转录的 RNA 和被转录的 DNA。这些都具有特异性。BLAT 估测以序列组成为基础。

结果　多重线性序列查寻将会列出鉴别配对物。点击详情链接可以提供图像，在图像中，错配碱基对和缺失染色体被加亮。此外，通过点击浏览程序链接可以得到线性基因排列，显示了序列查寻中鉴别基因部位的图像。BLAT 结果显示在 BLAT 搜索的你的序列的示踪轨迹中，有可能包括了一次 BLAT 搜索中的多重序列。

图像显示用户化

染色体组浏览程序尽可能地通过作为染色体下面的追踪而陈列的各种特征来显示染色体水平。导航非常直观。窗口顶端的独立按扭允许用户可以沿着染色体向前或向后移动和扩大或缩小。点击染色体位置标签可使显示放大 3 倍并集中图像。导航控制图像显示窗口，从而允许用户很快地跳转到另一个染色体或染色体碱基对位置。此外，显示器

任一边的按扭允许用户放大或缩小显示。特征陈列在追踪中，被位于页面下面的下拉式菜单控制。菜单区域允许用户或跟踪，或离开，或在完全模式和密集模式之间进行显示切换。

如果打开追踪，只需在图解视图中点击追踪标签即可在完全显示和密集显示之间切换显示。例如，一个 EST 映像的完全显示包括对一个特殊区域进行定位的所有的 EST。相对地，密集显示则是只对一个区域进行定位的一个 EST，没有定位编号的标记。

UCSC 染色体组浏览程序允许用户显示添加自己的评注。这并不将新的数据并入原始数据库中，但是允许用户在特定时期在 UCSC 注解的上下文中使用用户自己的评注可见。用户确定的评注可以多种形式提供在 UCSC 网站上（http://genome.ucsc.edu/goldenPath/help/customTrack.html）。用户可在 UCSC 网站上通过放置一个支持形式的文件公开地做自己的评注。用户可构造链接，通过该链接用户可适当地通过自定义追踪开启浏览程序。

下载序列

显示在浏览程序中的局部序列可以很方便地下载。图像显示页顶端的蓝色导航条包含一个示踪 DNA 的链接。下载页显示了用户要求的主要部分。用户对于下载序列拥有选择权，这些下载序列是重复的，或隐藏，或暴露，或具备固定示踪的特征或颜色。

数据格式

除了预先设置的图像视图，用户还可以使用列表格式来存取特殊数据。图像显示页顶端的蓝色导航条包含一个示踪表格的链接，该链接链接到一个网页，允许用户为下面的数据库明确表达简单扼要的查寻。通过这种形式，用户可以指定基因组中感兴趣的区域、感兴趣的表格及表格中的特殊字段。

查证基因模型

UCSC 网站并不生成基因模型，尽管如此，该网站会显示染色体序列的排列。这些简单的排列是其他两个网站的基因模型的基础。

FTP

染色组浏览程序中显示的所有数据都是有效的无病毒感染的 FTP。除了下载的集合序列，所有支持浏览程序的数据库表格都是有效的。这些表格包含所有显示在浏览程序中的表征原始数据（表 6.4.1 中的 FTP 信息）。

Ensembl

Ensembl 主要集中在对于集合基因组序列的表征描述。该信息作为视图，在上下文中显示（表 6.4.6）。

表 6.4.6 Ensembl 视图

浏览方式	描述
AnchorView	允许使用者在同一条染色体上选择 2 条特征，然后在显示基因组上这条区域上 2 个特征点之间的部分
Contig View	图形显示整合的基因组显示的不同注释特征，这种浏览方法等同于 UCSC Genome Browser 和 NCBI Map Viewer 浏览器.
Cyto View	以克隆为导向浏览整合的基因组信息，这种显示方向仅限于细胞遗传学信息、重叠群、克隆、基因，重复序列
DiseaseView	疾病相关信息（基于 OMIM），HUGO 基因命名法和 Ensembl 基因
Domain View	含有与基于 InterPro 的相似的蛋白区域的蛋白质索引
Family View	基于 Enright 与其同事未经发表的算法得出的属于同一基因家族的基因的目录
GeneView	是每个已知基因和预测基因的所有已知信息的集合，这个信息包括链接的外部资源
MapView	这是每条染色体的图谱浏览界面，提供文本的总结信息。例如，GC 含量和基因密度这些染色体信息的直方图解，同时还提供进入染色体其他浏览界面的快速链接
SageView	基于 SAGE 标签的作图的基因表达信息的集合
TransView	浏览支持基因模式的比对证据

Ensembl 是一个开放源程序文件，不仅数据是免费获取，而且全部软件包可以下载并且在任何一台 UNiX 机台上执行。

文本查寻

在 Ensembl 首面顶端有一个简单的示踪搜索可用于文本查寻。一个下拉式菜单允许用户对特殊数据（如基因、克隆、标记物、疾病等）的查寻给予限定。对于 Ensembl 的查寻基于 Alta Vista。因此，通配符和逻辑符号可以被执行。例如，“clath * 和小囊泡”是有效搜索选项。

通过输出数据选项可以将文本查寻限定在一条染色体上。在 Ensembl 首面，输出数据传输器将会执行一个查寻方式。在该首页上，混合查寻也可以执行，从而允许用户将查寻限定在一条染色体上或一条染色体的一个特定区域上。此外，其他限定也可以被用于查寻，如要求结果链接在一个特定的疾病或区域上。

结果　文本查寻返回结果列表。如果搜索全部数据集，结果将被资源聚集。结果列表对于结果给予简单描述。

点击 Links 到适当的 display（如基因突变引起的疾病检索应点击 DiseaseView，而匹配的基因检索应点击 GeneView）。

定位查询

使用定位查询有多种方式可以访问基因组。在 Ensembl 首页有一个标有 Browse Chromosome 的下拉菜单。这样用户可以指定一条染色体和一段碱基配对序列然后开始浏览。另外，通过 site map 能够访问 AnchorView。用户可以在 AnchorView 网页指定一条染色体。当染色体被指定后，可通过指定两个特征（如条带、contig、标记或者基

因）来确定感兴趣的区域。这些特征不需要是同类型，但它们必须是在同一条染色体上的特征。

定位查询也能通过MapView网页来实现。从Ensembl首页，选择一条染色体后，就可以进入MapView网页。用户有多种方式来进行定位查询，点击直方图和染色体模式图中的任何一个区域，用户将进入这个区域的AnchorView。用户限定两个标记后，点击Lookup按钮，就会在ContigView网页中显示这些标记范围的区域。

结果　所有的定位查询只能在同一条染色体进行，符合要求的区域通过ContigView显示。如果符合要求的区域较大（＞1Mb），则一个overview box提供只显示基因、标记和DNA contigs的granular view。当符合要求的区域＜1Mb，contig overview和contig detailed view都会被显示。

序列查询

Ensembl提供两种不同的方法来实现对基因组的序列搜索，即SSAHA和BLAST（见章节开始的词汇表）

在Ensembl的首页，有SSAHA网页的链接。SSAHA只能被用来查询核苷酸。用户能够剪切和粘贴一FASTA序列于文本框中，也可以从本地计算机上传文件。一般情况下，SSAHA只能检索当前的assembly。这里存在许多的SSAHA选项可供选择。

结果　SSAHA查询后，会弹出一个显示包含序列标识符，基于主题和查询的alignment位置、alignment定位、alignment长度和alignment鉴定百分比的结果清单。主题序列标识符被hot链接到ContigView，而alignment位置在ContigView图谱中是不被描述的。

从Ensembl的主页也能访问BLAST网页。从这个网页，能够实现DNA或者蛋白质的对比分析。这里能够查询多个数据库，包括assembled基因组、已知的或预测的cDNA、已知或预测的蛋白质。一般的BLAST选项在这里都存在。

BLAST的结果是以图表的方式来显示的。移动鼠标到图表中的alignments上，会弹出一个菜单，用户可以从该菜单中得到关于alignment的信息和实际alignment的选项，或者也可以转到ContigView中查看alignment。在本例中，转到ContigView会得到一个窗口，alignment在基因组中BLAST的结果在该窗口中以图解方式显示。浏览alignment，会见到在主题和查询之间一个典型的以文本形式显示的碱基配对的alignment。

自定义显示

只有在ContiView中的detailed view中才能出现这种自定义显示。上述的detailed view窗口有一系列的键。用户使用中间的键可以在50bp和1Mb区带之间进行放大或缩小。这些键也允许用户滚动左右限定的碱基：Window单元（zoom来限定，1或2Mb）

用户也能自定义在窗口中显示的注解。Ensemble把这些注解分成不同的Catagories、Features、Decorations和DAS sources。Features选项包括的东西有mRNA、CpG岛、GenScan模型和SNP。虽然contigs和tiling path也放在Decorations选项里，

Decorations 选项是序列上可计算的成分组成，如长度和 GC 含量。DAS sources 选项是一系列的外部注解并且包括一些用户限定的选项。要获取更多 DAS sources 的信息，请登录网站。

用户通过这些下拉菜单来打开/关闭轨道。在 Features 和 Decorations 菜单的底部是一些高级的选项。点击这些选项会链接到新的网页，在这些网页上，用户可以自定义要浏览的 tracks、颜色和显示的范围。

在 ContigView 窗口中移动鼠标到已经显示的 feature 上，会出现一个上弹菜单，该菜单包含了更多关于 feature 的信息，并且提供了一个相关链接的列表。导航标尺提供了一个上弹菜单，该菜单可以控制缩放导航，或者允许用户把显示结果带回中心。

通过 detailed view 顶端的 Jump To 菜单，用户可以看到这个区域在 CytoView 和 UCSC 浏览器上其他的浏览。这个菜单也提供一个链接到 MapView，但这只能使用户链接到特定染色体的 MapView 网页。

下载序列

在 detailed view 的顶端可以发现 Exprot 菜单，用户可以通过该菜单下载感兴趣区域的序列。从这个菜单中点击选项，会弹出一个新的网页（ExportView），从该网页可以以 FASTA 文件和 EMBL Flat File 格式自定义和下载感兴趣的区域。

显示格式

Export 网页也允许用户以列表的形式（如清单形式）显示注释信息。用户能够通过点击 boxs 中提供的形式来控制显示的清单，如用户能够列出在 5 号染色体碱基 34488143 和 35488143 之间的已知疾病基因的清单。另外数据的图标表示法可以以 4 种不同的格式（PNG、PS、SVG 和 WMF）输出。

观察基因模型证据

能够观察到两个不同水平的基因模型证据。在 GeneView，能够得到 alignment 和周围叠接位点的信息。TransView 提供基于这些模型的相似蛋白质数据检索。从现存物种中鉴定的基因模型给出的分值高于出现在新物种的基因模型。

FTP

Ensemble 软件和 assembled 基因组、cDNA 和多肽都是可以下载的。数据都可以通过 FASTA 格式、GenBank 和 EMBL 格式获得。另外，所有的注释数据能从 MySQL 数据库（该数据库储存 Ensembl 数据）以 SQL 方式进行信息转储。这些图表很容易输入进大多数数据库。

NCBI

NCBI 提供几个补充的资源使得带着不同问题访问人类基因组数据变得更加容易。这些资源存在有效的数据库设置，并且有广泛的交叉链接与之链接，这样很容易操纵这些信息空间。在表 6.4.7 中列出了一些重要的相关资源。这些资源可能用于检索基因功

能、相关疾病、克隆有效性、表达、突变、基因结构、基因组背景、基因组转录和蛋白质序列的信息。处理人类序列数据时，人类基因组资源网页（HGR）是访问 NCBI 一系列资源的主要位点。MapViewer 资源是访问人类基因组数据 assembled 注释的主要位点。这些资源能从 HGR、LocusLink 和基于 alignment of accession 到 assembled 序列的 Entrez 中访问。表 6.4.5 提供了对 MapViewer 资源提供服务的一个概述，包括简单和高级查询、基于序列的查询和一般的浏览。两个主要的窗口来提供信息：基因组概述的方式提供查询结果和以特定染色体图谱浏览的方式提供详细的信息。序列和图谱数据都可以从自定义区域下载。全基因组数据可以通过 FTP 方式下载。

表 6.4.7　NCBI 中有效的人类基因组资源

资源	描述	URL
Clone Registry	记录克隆序列情况和分布信息	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/clone
dbSNP	多态性数据，小范围的插入/缺失和重复元件的多态性	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP
Human Genome Guide	概述有效的人类基因组资源相关资源和个别指导的链接	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human
LocusLink	关于选择机体遗传性位置的描述信息，伴有相关资源和序列数据的大量链接	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink
Map Viewer	包含已注释基因组 assembly 的染色体图谱集合浏览，包括基于几种坐标系统的图谱	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/map _ search
OMIM	人类基因和疾病目录	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM
RefSeq	NCBI nonredundant 参考序列数据库基因注释的 Ongoing curation effort 和试剂	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLinkRef-Seq.html
UniGene	相关转录序列的集合，包含组织表达信息和相关资源的链接	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/index.html
UniSTS	统一标准的 nonredundant 序列标签位点(STS)数据库	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/sts.index.htm

基于文本的查询

可以通过以下方式来查询信息：标识符（如 accession 或 MIM 号）、标识名（如 D7S2742）或者一个文本词条或短语（如基因标记、基因名称、疾病名称）。也支持高级的文本查询，包括多个查询词条的使用、通配符（如 * ）、Boolean 运行符号（如 AND、OR、NOT）、字段限制、预定义特征。因此，它可以查询一个基因家族，并限定在一个或多个染色体上家族的数目，或者查询与已知疾病相关的基因家族。关于简单检索和高级检索的选项信息，可以通过资源里的帮助文档来了解。

结果　在基因组中查询结果相关位置的图解表示法和染色体位置、经鉴定的匹配序列，包含与查询相匹配的特定图谱的列表摘要，这些原始的查询结果都在 Genome View 网页中显示。在 Map Viewer 中提供几个选项来浏览这些查询结果。

1. 在图谱的综合窗口（overview）点击感兴趣的一条染色体，浏览这条染色体所有的查询结果。

2. 在表中点击 Map Element 链接，浏览所有图谱上列出的基因座（如一个基因查询可以返回到细胞遗传和序列图谱）。

3. 在表中点击一个图谱的名称，查看被选择图谱上的基因座。

点击这些选项中的任何一个，都能链接到 MapViewer 图表显示网页。在这个显示中，查询的条目是突出显示的。用户可能会感觉转换到 Map Viewer 图表显示很慢。这是因为为了显示在不同坐标系统中的图谱，大量的计算正在运行。在不同图谱中的一般选项也正在运行。

基于定位的查询

定位查询只能在单个染色体浏览中进行；基因组的综合浏览不支持这种查询。输入位置信息到位于显示页面旁边栏中的 Region Shown 框，或者使用 Map&Options 格式来完成（见自定义显示下面）。位置查询能够在序列和非序列的坐标中执行，包括厘摩、century、细胞遗传条带。这界面也支持标记名的输入，包括基因符号。

结果　提供的划定界限之类的坐标和词条，能够用来来回拉动 Map Viewer 图谱的显示。实质上，是以感兴趣区域为中心，执行一个精细的限定的缩放。用来限定浏览的位置和词条是不突出显示的。

基于序列的查询

通过使用人类基因组 BLAST 网页，用户可以查询以一段核苷酸或蛋白质序列开始的基因组。人类基因组 BLAST 网页能够从 Map Viewer、BLAST 主页或 HGR 网页访问。提供几个 blast 数据库用来便利地在基因组、转录物或蛋白质中找到匹配的结果。BLAST 结果网页能便利地访问 Map Viewer 或 LoucusLink。

结果　在基因组数据库中进行查询后，BLAST 结果网页包括一个链接浏览基因组上下内容的 hit。点击 Genome View 键，会出现一个基因组综合浏览的网页，该网页上，BLAST 结果的位置在染色体综合浏览上突出显示和图表显示摘要。图表显示的摘要包括一个到 MapViewer 的链接和返回 BLAST alignment 网页（Score 栏）。Map Element 链接至一个 Map Viewer 显示，该显示能缩放到包含 hit 的区域。BLAST hit 的位置是突出显示的，并用一个文本摘要来显示 identity 百分比和查询序列的相对应区域。也提供浏览每个对齐的区域。这些都提供一个强大的机制来证实是否基因组序列是否是一个最新证实的 cDNA，或者使用序列的相似性来确定其他相关的基因组区域、转录物和蛋白质。

自定义显示

染色体-定向图表浏览通过垂直定向的方式来显示。位于左边栏中的略图提供了一

个初略的显示区域指示和用来对染色体进行初步的上下滚动浏览（点击要浏览的区域）。低分辨率浏览时，在所有的图谱中都有一些简明的标记来作为界标。当鼠标移到感兴趣的区域上时，会显示附加的文本信息。在 right-most 图谱中（命名为 Master Map），提供了更多详细的文本信息。这里也提供了一些链接，这些链接能访问序列数据和相关 NCBI 资源，便利 navigation 到扩充的信息资源。MapViewer 在图谱显示页面提供了几种 zoom、navigation 和简单的图谱显示控制。在一个单独的页面提供了更多高级的控制（如点击 Map&Options 链接会出现 Map&Options 框）。边栏中缩放控制框或者通过提供的数字范围或限制的标记，如标记的名称、基因标识或在 Region Show 文本框中的细胞遗传条带。这些都可以用来改变浏览时分辨率的水平。另外，可以通过简单地点击图谱中感兴趣的位置来改变 zoom 和 navigation。这会弹出一个菜单用来预先设置 zoom 的水平，开始浏览中心的选项或打开一个新的浏览窗口来显示序列的选项。这些能便利快速地得到感兴趣区域的高分辨视野。

点击 Map&Options 链接来自定义 Map Viewer 显示。点击后会弹出一个新的窗口，这里有大量有序的可以显示和被定义的图谱。这些图谱通过常用来限定图谱的坐标系统被编组（可使用的图谱见表 6.4.4）。为了显示的目的，在 assembled 序列注释的特征被作为不同的图谱浏览来处理，这与 Ensembl 和 UCSC 的处理是相似的。因为所有的序列图谱都是通过使用同样的基因组 assembly 产生的，所以序列坐标能够直接用来比较。Map&Options 工具栏也提供一些选择来增加标尺、view werbose、精简的文本描述、网页长度的修饰或定义显示的区域。这里也有一个显示图谱之间联系的选项。

序列下载

点击 Download/View Sequence/Evidence，会出现一个新的窗口。在这窗口用户可以重新定义区域的大小和用 FASTA 或标准 Flat Flat 格式来选择下载或者浏览 assembled 基因组序列。在基因显示的 Seq 链接也提供访问这种下载的功能。另外，在 Date as Table View 中提供到下载网页的链接（如下）。

显示格式

通过左边栏中到 Date as Table View 的链接，可以访问一个表格记录，该表格记录对应相应的限定图表显示。该网页提供了正在被显示区域发现的所有对象的清单。该网页也包括一些选项，这些选项可以用来保存所有的对象或图谱特定子集的数据到本地文件中。

基因模型 evidence 的浏览

两个资源能突出显示 evidence，支持任何提供的基因模型。序列图谱中（当在 Master Map 位置的时候）提供的 ev 链接能访问到 Evidence Viewer 网页，该网页提供了更多关于转录 alignments 的详细信息。这些转录 alignments 通常被用来限定被注释的基因。该网页提供一个有关 aligning transcripts 的图解示意，序列 alignments、预测翻译及在图解和 aligned 序列内都突出显示序列的不同之处。

一个命名为 Model Maker 的附加显示（从基因序列图谱中点击 mm 链接），提供一

个所有转录 alignments（mRNA 和 EST）的图表示意、GenomeScan 模型和在 contig 中所在位置被注释过的基因模型。Model Maker 提供一个独一无二的服务，允许用户选择单个外显子片段来重新构建一个模型，该外显子片段通过 alignments 来限定。因此，这决定于一个给定的外显子应不应该包含在目的基因模型中。Model Maker 能够用来重新构建包含或者排除任何预定外显子的基因。

FTP

所有在 NCBI 中能获得的数据是公共资源并都能通过 FTP 方式获得。这些包括在 Map Viewer 中提供的数据，包括序列数据、染色体支架数据和图谱数据（表 6.4.1 的 FTP 信息）。

如何检索信息，通过列举一些问题来说明

列举问题来说明如何在 Ensembl、NCBI 和 UCSC 网站进行信息检索。值得注意的是 Ensembl 和 NCBI 网站的建立，以至于能够通过多种方式来检索信息。这些问题的答案可以通过多种方式获得，不仅仅是这里提供的方式。

使用官方基因标识或名称，如何检索信息？

UCSC

操作　在 Genome Browser 主页，把基因名称输入到查询栏中。

结果　查询的结果中会被列出多个到基因组浏览器的链接。在 Genome Browser 是没有指示的，基因在对应查询的区域。

Ensembl

操作　在 Ensembl 网站的几乎任何网页把基因名称输入到查询栏中。在查询所有的索引或通过特殊的特征类型来限制查询内容中选择一项，本例中是已知基因。在 ContigView 中，查询的词条是没有突出显示的。

NCBI

操作　LocusLink 查询是用来搜索相关已知基因扩展的描述性信息的。该查询能够在 LocusLink 主页、HGR 主页或者 NCBI 主页中实现。MapViewer 查询是用来直接查找已知基因基因组位置的。该查询可以通过染色体位置或其他的特性来限定。在许多网页，包括 HGR 主页和 LocusLink，都能进行简单的查询。而高级的查询网页需要从 Map Viewer 直接进入。

结果　使用 LocusLink 所有基因名称相关的记录都可以以清单的形式显示出来。LocusID 用来链接到扩展基因报道的页面。使用 MapViewer，查询的结果以基因组概貌图谱的形式和表格报道的形式显示。点击一条染色体或单个的查询结果，可以访问详细的特定染色体显示。在该显示中匹配的查询结果会突出显示。

已经绘制了 4 号染色体上两个标识之间的一个表型，如何确定这个区域的物理尺寸和获得这个区域内的所有候选基因？

UCSC

操作　单独查询每个标识并记录好每个标识的碱基配对位置。使用这些标识的碱基配对位置来进行一个碱基配对范围查询（如 4：567897～577898）。

结果　如果被指定的是有效碱基配对坐标，查询完成后，将会出现一个 Genome Browser 图表显示。为了获得这个区域候选基因的清单，在图表显示窗口使用蓝色 navigation 栏中的 Tables 链接。使用这些特征，用户可以获得一个基因的清单，或者被预测的基因及它们在候选区域的位置。

Ensembl

操作　从 Ensembl 主页选择 AnchorView。选择标识类型并在文本框中输入标识名称。

结果　如果两个标识都用基因组序列代替，查询的结果会转到 ContigView，如区域的大小>1Mb，则只会显示概貌图。而如区域大小<1Mb 或更小的话，则概貌图和详细浏览都会被显示。为了获得该区域候选基因完整的清单，可以点击位于 detailed view 菜单顶端的 Export 选项并选择 Gene List。

NCBI

操作　使用 Boolean 逻辑中的 OR（如 D4S2931 或 D4S819），在 Map Viewer 查询页面中查询两个标识。

结果　执行完一个查询后，在基因组概貌显示中点击 4 号染色体，会弹出与之匹配的所有图谱的图表显示。查询的词条（或别名）突出显示在所有包含它的图谱上。在基因组 assembly 中区域的同等物理位置，能够通过与 STS 序列图谱和 Genes-seq 图谱的对比来发现。如果查询的标识通过 alignment 在序列图谱上直接被替代，则会在绘制好的标识和序列坐标间出现一个直接的对应。如果在基因组 assembly 中标识没有被直接替代，则可以通过查看邻近标识的布局来推测其位置。这些邻近标识都在 RH 图谱和序列图谱中被替代了。一旦该区域在 STS 序列图谱中得到确定，可以通过直接对比 Genes-seq 和 STS 图谱来确定候选基因。

如何发现与一种疾病相关的所有 Pax 家族基因成员和至少一个 SNP？

UCSC

操作　在 UCSC 浏览器中，这是一个困难的操作，因为 wild cards 在搜索引擎中不能使用。用户必须已经有一个 Pax 基因家族成员的清单，从 Genome Browser 标题页查询每个基因。

结果　如果每个基因在基因组中被绘制成了单个位置，查询后会出现一个该基因周围区域的图表浏览。为了在该基因中证实 SNP，要确定两个 SNP track（随机 SNP 和

重叠 SNP）是开启的。

Ensembl

操作　从 Ensembl 标题页选择 Export Data。在结果查询形式中选择 Gene List。在 Region 选择形式中选择 Entire Genome。在 Restrict Selection 选项中，只选择 Disease Genes 项。滚动到 Include Disease 数据选项，选择 disease description 或 OMIM number。滚动到页面下方的 Include SNP 数据选项。在这个选项顶部的文本框中，指定用来搜索的 flanking 序列的距离并点击获得的 SNP Ids。在该表单的底部选择所需要的格式。

结果　查询后会出现所有 Ensembl 基因认同者和 SNP Ids 的清单。每一条 SNPid 都会返回单独的一行记录。如果选择的是 HTML 形式，基因认同者将被链接到 GenView。如果选择的是 OMIM 号，则会被链接到 DiseaseView。SNPid 是不被链接的，但它可以被剪切和复制到其他的 SNP 数据库。

NCBI

操作　使用 Map Viewer Advanced Search 页面，支持 wild card 查询 PAX* 和选择只搜索 With a Disease Known 和 With Variation Known 的记录。

结果　这次查询结果中出现了 10 个基因。点击 Map element 链接，会弹出一个可缩放的染色体显示结果。使用 Display Settings 工具栏来调节图表的变化。

从 *C. elegans* 得到一蛋白质序列，如何证实是否人类基因组中存在一个同源序列？

UCSC

操作　从 UCSC 标题页选择 BLAT 搜索选项。粘贴蛋白质序列到文本框中，并从 Query Type 下拉菜单中选择 Protein 项。

结果　蛋白质 BLAT 是用来鉴定至少超过 20 个氨基酸、80％相似性序列而设计的。因此，通常情况一个 *C. elegans* 蛋白可能与人类的分歧太大而不能查找到同源序列。然而，如果蛋白质是高度保守的，查询后将给出一个匹配的清单和它们基因组的位置。

Ensembl

操作　从 Ensembl 标题页选择 BLAST。该操作能够进行一个多肽数据库（分为已经证实的和预测的多肽）搜索和基因组翻译的搜索。

结果　该查询能得到 BLAST hit 基因组位置的图谱和 hit 的图表清单。把鼠标置于图表中的 hit 上，能出现一个 pop-up 菜单。该菜单提供了关于 blast hits 更加详细的信息和到 ContigView 的链接并能浏览 alignment。点击图表清单中的链接，将能出现 alignment序列碱基配对的浏览网页。

NCBI

操作　在人类基因组中执行一个 BLAST 查询，你能够选择直接查询 model 蛋白，或在基因组 assembly 中执行一个翻译 BLAST 的搜索。

结果　如果你查询的是 model 蛋白数据库（XP-accession），则你的查询结果页面中会出现到 LocusLink 的链接；通过位于扩展基因报告接近页面顶部的黄色 Maps 键，你能够导航到浏览基因组上 locus 的位置。基因组数据库中的查询后会出现得到结果网页，该网页提供直接到 Map Viewer 的链接来浏览基因组当中的结果。

如何证实一个包含目的基因的 BAC 克隆？

UCSC

操作　使用基因的名称或标记来进行文本查询。

结果　该查询将可能出现一个与该基因组相关的特征清单（如 Known Genes、GenBank mRNA）。点击位于 Known Genes 标题下面的链接，在浏览器中将会出现一个该基因的图谱浏览。使用该显示下方的下拉菜单转到 Assembly tack，并点击刷新键。这样会出现一个 accession number，该 accession number 是被使用于构建的那部分确切的基因组。当前，从该浏览器没有方法得到确切的克隆名称，但这 accession number 能够被复制和用来在 NCBI 克隆登记中进行查询。

Ensembl

操作　从 Ensembl 标题页搜索基因名称或标记来做基因索引。

结果　到 Gene View 结果网页，在 genome location section 中，点击到 ContigView 的链接。从 Jump To 下拉菜单中，选择 CytoView，这会得到一个在包含感兴趣基因的区域克隆设置的浏览网页。

NCBI

操作　使用基因标记或名称来进行文本查询。也可以在 assembled 基因组序列中，使用序列来进行 BLAST 查询。

结果　一旦你已经检索了一个染色体显示你的查询结果，增加 GenBank 图谱（像 Master Map），通过使用 Display Settings 工具栏来显示。当 Gene _ sequence 与 GenBank图谱做比对时，查询词条会被突出显示，这时容易证实在基因组的该区域是哪些或那个进入有助于组装。GenBank 图谱的描述性文本包括那些到 Clone Registry 的链接，在那里可以获得分布信息。

刚好克隆了一个新的人类 cDNA，如何确定它在基因组中的位置？

UCSC

操作　使用 BLAT 搜索选项来查询基因组 assembly。

结果　一个包括匹配基因和它们位置的清单。该清单中有浏览 alignment 和图谱浏

览的链接。BLAT hit 的位置在该浏览器中没有显示。

Ensembl

操作 使用 SSAHA 来在 assembled 基因组中进行序列搜索，也可以进行 BLAST 搜索。

结果 当使用 SSAHA 时，如果 assembled 基因组包含该 cDNA，会出现一个与基因组匹配的结果和基因组位置的清单。基因组位置将被链接到 ContigView，但 SSAHA hit 不会显示。当使用 BLAST 时会显示基因组浏览图谱，hit 的位置通过箭头指出，下面还会有 alignment 的图表清单。另一个特征是，从该网页链接到 ContgView，在 ContgView中将显示 BLAST hit 的位置。

NCBI

操作 把 cDNA 序列作为一个 BLAST 在基因组序列中进行查询。

结果 BLAST 结果网页包括一个到 Genome View 的链接，在 Genome View 中 hit 在基因组中的分布是用图谱显示的，显示包括鉴定的百分比的指示和查询对应的坐标。因此，一个一般的内含子/外显子结构可能是完全可见的，并且如果查询序列的区域与基因组不比对很容易显示出来。

经常问到的问题

为什么我的基因在染色体上会出现变化?

一个 contig 的位置和它的注释特征可以随着时间的变化而变化，以下变化是自然的。

1. Contig 位置轻微变化到邻近的位置。
2. Contig 移动到染色体的不同的臂。
3. Contig 重新位于不同的染色体。
4. 一个以前没有定位的 Contig 被定位于一染色体上。

由于基因组并入了新的序列数据，进行了规律性再集合，因此小的次序改变会增加。由于增加的已完成的序列成为可行性和 assembly 图谱，Contig 位置可能会出现变化。如果 underlying GenBank 序列的染色体位置改变，大的变化也可能出现。这种大的变化是不多的，除非出现如下几种原因。

1. GenBank 记录被更新以致改变染色体位置注释。
2. 人类基因组计划染色体委员会（或其他的个人交流）提供了一个新的染色体位置。
3. 通过使用不同的输入信息或整合新的染色体位置信息资源来修饰 assembly 过程。

为什么在一个网站能见到我的基因，而在另一个网站上却见不到?

基因组 assemblies 是基于数据在不同点及时“冻结”而成的。在 NCBI 中所有的

assemblies 给有一个 build 号，这与从详细的数据库列出的 gi 是相关的。Ensembl、UCSC 和 NCBI 运行的是独立的注释流水线，所以每个站点显示的注释信息在不同的版本是不同的，如一个基因可以在一个网站注释，但在另一个网站却不行。这是因为一个最新的“冻结”数据得到了更多该基因已完成的序列。或者是获得了最新定义可行的 mRNA 序列。如果用来定义该基因的 mRNA 不再与该区域相符，拼接重复序列与草稿序列的差异会影响对该区域的注释。并且，在每个网站注释流水线中小的区别，如使用不同的 alignment 参数和 cut-offs，能导致一些基因只出现在一个网站。

在 Contig 序列中“N”代表什么？

NCBI contig 可以包括从草图序列投递中衍生出来的片段，它能够与相关的其他可行性序列区域进行排序。但通过该序列，不能提供完整的相邻近的序列。在记录中加入一系列的 100N’s 来代表缺口的位置。Contig 间缺口被任意设置为 10 000 核苷酸，直到提供了可行的真正缺口大小信息来完善染色体信息。

为什么在基因组中不能发现我的基因？

如果查询文体词条不符合检索要求，或者如果对于感兴趣的基因来说，基因组序列过于简单，那么基于文本或序列信息的检索可能失败。如果使用文本查询，考虑试着改变一下名称来查找该基因。如果随着基于序列的查询，没有明显的 hits 出现，是因为提供查询的基因组序列是非常有限的，以至于感兴趣的基因可能位于某个区域，由于基因组序列没有完成，因此一些 cDNA BLAST 查询可能在 assembled 基因组中不能够证实该基因。

参考文献：Kent，2002；McPherson *et al.*，2001

编　　者：Deanna Church and Kim D. Pruitt

单元 6.5　使用 Entrez 来检索 NCBI 数据库

基本步骤 1　Entrez 检索

Entrez 的网址是 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez（图 6.5.1）。在网页顶部蓝色栏中或者在左手边的边栏中，NCBI 网站的大多数网页都提供一个直接的链接到 Entrez。特别提到，在基本步骤 1 提到的例子来检索 PubMed 数据库，而相似的搜索过程可以在任何 Entrez 数据库中进行。

特别提到，有一个名为 Network Entrez 的程序，可以用来代替安装启动至 Web-based 版本的 Entrez。这是 Entrez 程序中最快的一个，在该程序中可以直接联系到 NCBI “分配器”。图谱用户界面的特点是有一系列的窗口，每次要求一条新的信息时会在屏幕上出现一个新的窗口。自从这客户软件存在于用户的电脑上时，用户可以自己决定获得、安装和保留该软件。作为一个新的特点，该软件可以定期更新下载。它本身的安装过程也是很平常的。Network Entrez 与 Cn3D 是捆绑使用的，图谱三维浏览器在单

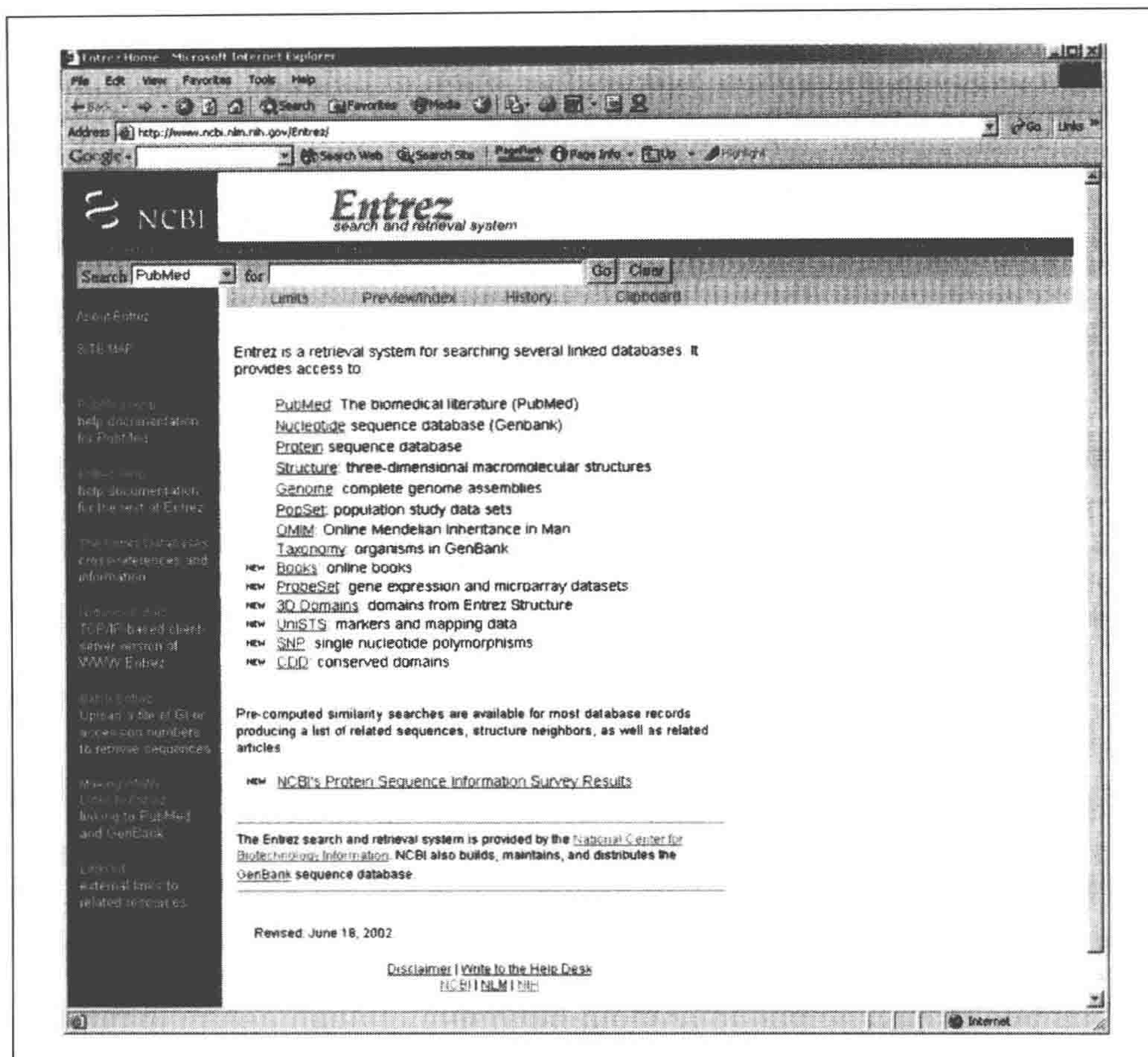


图 6.5.1　Entrez 网站

元后面的章节将被描述（基本方案 2）。Network Entrez 安装启动在这里不做特别的讨论，但发出查询的逻辑和通过 NCBI 信息空间导航在实质上是完全一致的。

材料

一个更新的网址浏览器，如 Netscape Communicator 或者 Internet Explorer

Entrez 数据库的选择和搜索

1. 从 Entrez 主页（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez；图 6.5.1）进入。在本例中，从 Search 的下拉菜单中选择 PubMed。
2. 在 For 文本框中，输入如下字段

   atherosclerosis [MH] AND aspirin [NM]。

   使用 Boolean 逻辑术语，如 AND、OR 和 NOT 是查询 Entrez 系统最简单的方法。请注意，如想得到想要的结果，查询所用的所有 Boolean 逻辑术语都必须大写。

在搜索栏中查询使用的 [MH] 和 [NM] 是资格限定的词条，使用它们来搜索主题词和 substance 词。可行的搜索限定词在表 6.5.1 中已经列出。值得注意的是，在使用这些限定词时要加上括号“[]”。

表 6.5.1　Entrez Boolean 检索参数

General	
Syntax	
Search term [**tag**] Boolean operator[a] search term [**tag**] …	
Where	
[**tag**] =	
[AD]	附属机构
[ALL]	所有领域
[AU]	作者名称 O'Brien J [AU] yields all of O'Brien JA，O'Brien JB，etc.　“O'Brien J” [AU] yields only O'Brien J
[RN]	酶学委员会或化学摘要服务号
[EDAT]	Entrez 日期 年/月/日、年/月或年
[IP]	出版杂志
[TA]	杂志名，官方缩写，或 ISSN 号 Journal of Biological Chemistry J Biol Chem 0021－9258
[LA]	语言
[MAJR]	MeSH 主题词 在论文中讨论的主题词之一
[MH]	MeSH 词条 Controlled vocabulary of biomedical terms (subject)
[PS]	Personal name as subject use when name is subject of article，eg.，Varmus H [PS]
[DP]	出版日期 年/月/日、年/月或年
[PT]	出版类型 综述、临床试验、讲座 Letter、技术刊物
[SH]	副主题词 用来修饰 MeSH 词条
[NM]	物质名称在论文中讨论的化学品名称
[SI]	二级资源 ID 名，来自二级数据库
[TW]	文本词条 所有的文字和数字，出现在标题、摘要、Mesh 词，副主题词、化学物质名称、人名 MEDLINE 二级资源
[UID]	特异性 ID (PMID/MEDLINE 号)
[VI]	杂志卷

a Boolean operator＝AND、OR 或 NOT。

3. 点击 Go。在 2002 年 4 月运行该查询，得到 443 篇文献（图 6.5.2）。

用户可以插入更多的词条和限定词来进行查询，得到一个更具体的搜索。

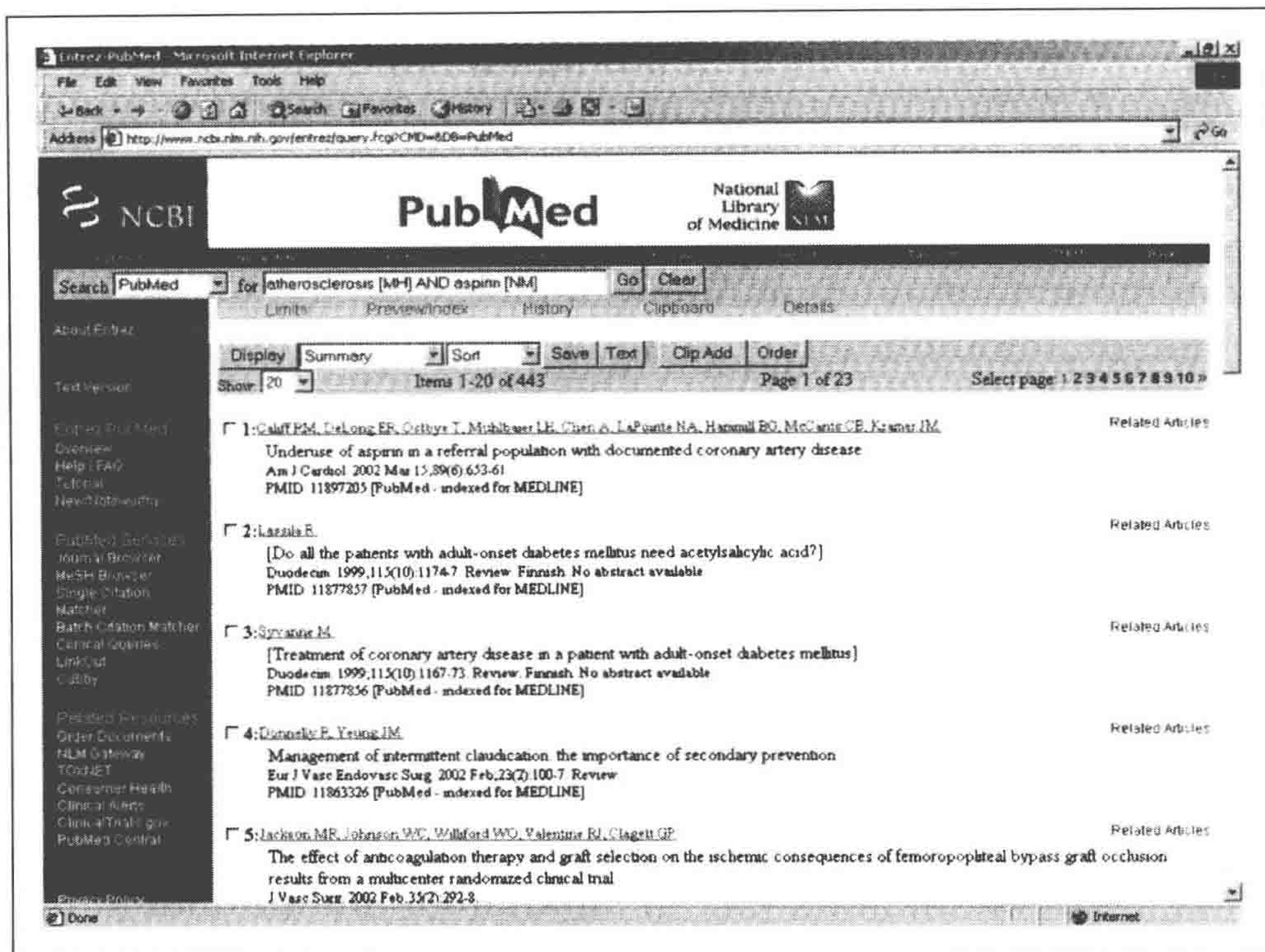


图 6.5.2　使用 Boolean operators 来对 Pubmed 进行基于文本的 Entrez 查询。初始的查询显示在靠近窗口顶部的 Search 文本栏中。每个条目给出了作者、文献标题和引用信息。点击作者姓名的超链接能够得到确切的记录。详情见下文描述。

4. 经过如下方法中的一种来搜索一个特定的作者，得到一系列的文献。
   a. 选择单独的网页页码链接（选择网页：1，2，3，4，…），通过阅读来观测列表中的作者，来选择文献。
   b. 从 Sort 下拉菜单中选择 Author，然后点击 Display 并滚动根据字母排列顺序排列的列表来选择。
   c. 在 For 文本框中输入作者的名字，加到原始检索标准后（AND Smith），点击 Go。

　　关于“c”步骤的操作，输入“AND Cayatte”，增加到最初的查询后，这时 For 文本框中就出现了“atherosclerosis [MH] AND aspirin [NM] AND Cayatte”。点击 Go。

浏览一个单独的数据库记录

5. 选择作者超链接来显示被选文献的 Abstract 浏览。Abstract 浏览的标准格式包括文献的标题、所列出的作者、作者所属的机构和文献摘要本身。Cayatte 等作者文献的摘要见图 6.5.3。

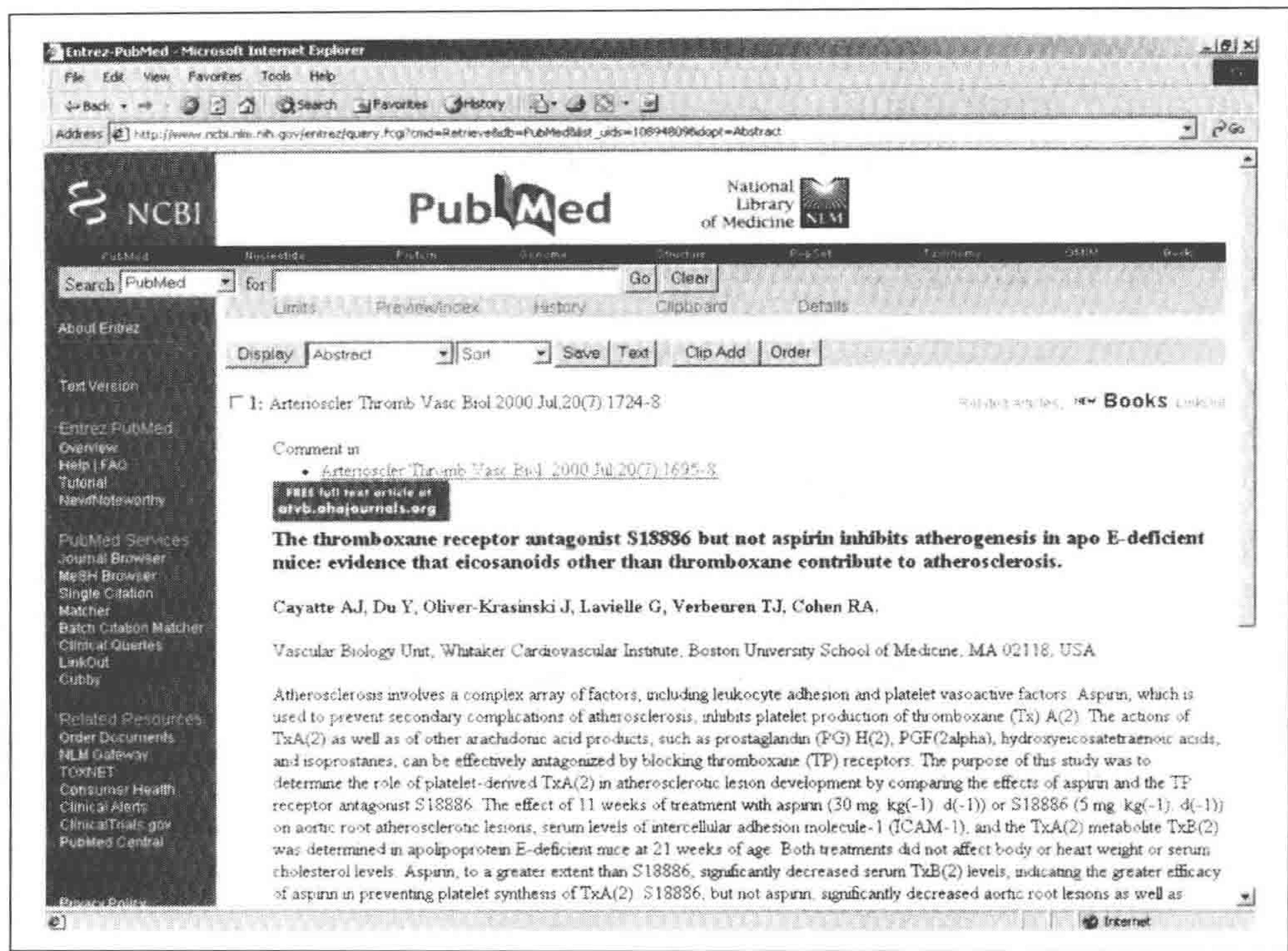


图 6.5.3　例举通过 Entrez 检索在 Abstract 形式显示的一个 PubMed 条目，被选中的 Abstract 浏览是 2000 年 Cayatte 等的文献。该浏览提供了 Related Articles 链接、Books、LinkOut 和确切的全文期刊文献。详情见下文描述。

6. 选择位于 Display 键旁边的下拉菜单来改变显示。选择 Citation 并点击 Display，转换成这种格式后，会出现一个 a similar looking entry。然而，目录信息（如 MeSH 主题词和被检索的 substances relating to the entry）显示在摘要的下方。

   从下拉菜单中选择 MEDLINE 并点击 Display。在左手边输入栏中使用两个字母形式的代码来表示对应的每个领域内容，这样会出现一个 MEDLINE/MEDLARS 布置（如作者领域用代码 AU 来表示）。用这种格式输入能够被保存，并容易输入到第三方的书目（提要）文献目录管理程序，如 EndNote 和 Reference Manager。

7. 从下拉菜单中选择摘要并点击 Display 来进行摘要浏览。
8. 要浏览全文，选择位于出版机构名称下的 Full-Text 在线超链接。拥有适当的个人或者机构的特权，用户可以浏览文献的全文，包括所有的图表。

寻找相关的资料

9. 选择位于摘要显示右手角落上方的 Related Articles 链接（图 6.5.3）。

在 2002 年 4 月，Enterz 显示这里有 162 篇文献与原始的 Cayatte 参考文献有相关相似的主题内容。在图 6.5.2 中，列出的文献是非常相似的。在列表中的第一篇文献是相同的 Cayytte 文献，因为它与自己本身联系是最密切的（the“parent”）。下面的文献是根据相似性统计来进行排序的。因此可以认为靠近 the parent 越近的文献与 the par-

ent 主题内容越相似。

10. 点击浏览器上的 Back 键可以返回到 Abstract 浏览页面。
11. 选择 Books。该链接能使用户进入一个充满超链接的原始引用文版面。
12. 选择 atherosclerosis 的超链接，显示出 5 本书的略图。用户可以通过 NCBI 来获得这些书的全文。
13. 选择 *Molecular Biology of Cell* 书的两个 items 链接。这两个 items 链接显示 Cells Import Cholesterol by Receptor-mediated Endocytosis 和 Normal and Mutant LDL Receptors。选择 Cells Import Cholesterol by Receptor-mediated Endocytosis 这个超链接。
14. 点击 Back 键三次，回到充满超链接的原始引用文版面。
15. 点击这一组最后面的链接 LinkOut，该链接位于显示页面的右上方（图 6.5.3）。
16. 在 Cubby 中存储搜索结果（支持方案）。

支持方案　用 CUBBY 来保存搜索条目和结果

使用 Entrez，当在 PubMed、Protein、Nucleotide、PopSet 和 Books 数据库中检索时，可以用到蓝色边栏中的 Cubby 选项。

一些重要的 Cubby 注释

1. Related Articles 的链接不能够作为一个 Cubby Stored Search 来保存。
2. 经常使用来联合检索的检索历史序号（如＃1 AND ＃2；见备选方案）不能在 Cubby 中保存。
3. 在保存检索时不推荐保存日期和日期段。
4. 保存的检索条目被编号和根据最初所保存的日期和时间进行降序排列。
5. 每个用户允许保存最多 100 个检索条目。
6. 已经保存的检索条目不能够进行编辑。

材料

一个更新的网址浏览器，如 Netscape Communicator 或者 Internet Explorer

注册和登录

1. 在 PubMed、Protein、Nucleotide、PopSet 或 Books 数据库中进行完一个检索时，点击边栏中的 Cubby（图 6.5.2）。

2a. 如果在 Cubby 中没有注册，从 I Want to Register for Cubby command 中点击 Register。

进入如下界面：

a. User Name（3 to 10 characters）

b. Password（6 to 8 characters）

c. Mother's Maiden Nameor Pet's Name in the event the password is forgotten.

点击 Register。一经注册，你就会自动登录 Cubby。

2b. 如果已经注册，但还没有登录的话，可以从边栏中选择 Cubby，然后输入你的 User Name 和 Password，点击 Login。登录的状态将维持 12h。

在 Cubby 中保存一个检索条目

3. 大多数近期的搜索显示在屏幕的 Last Search 区域中。在 Cubby Search Name 文本框中编辑查询的条目，改变搜索的名称换成容易管理的名称。

   如果 last search 没有显示，可能是你的系统不允许接受 Cookies。如果问题仍然持续，则必须联系系统管理员。

4. 在 Cubby 键中，选择 Store，见图 6.5.4。

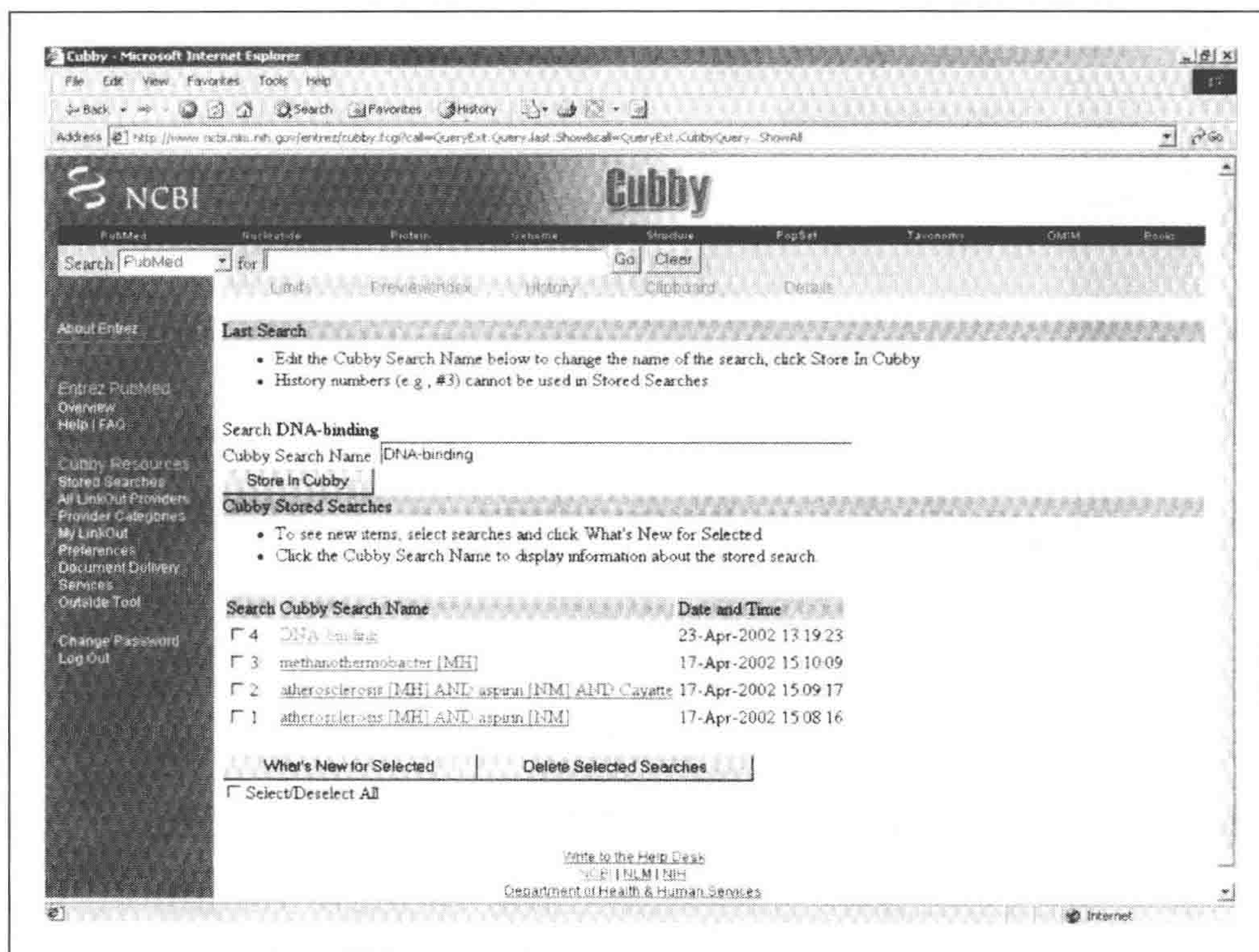


图 6.5.4　Entrez 检索的储存地点叫做 Cubby。Entrez 提供这样一个检索储存地点来储存查询条目。储存的条目能够被再次提取出来并及时更新，而不必再重新输入查询条目。因此提供了一个有效的途径来更新查询结果。详情见下文描述。

检索和更新一个 Cubby 检索条目

5. 在 Search check 框中，通过点击上述的 Cubby Search Name 来选择一个或多个保存了的检索条目，如点击 Search check 框中所有的检索条目。

6. 选择 What's New for Selected 键，Cubby 列出被选择的检索条目，数字表明自从进行最近的检索后，出现的新文献的数目。如果没有新文献出现，则在 What's New 栏中会显示 0，见图 6.5.5。

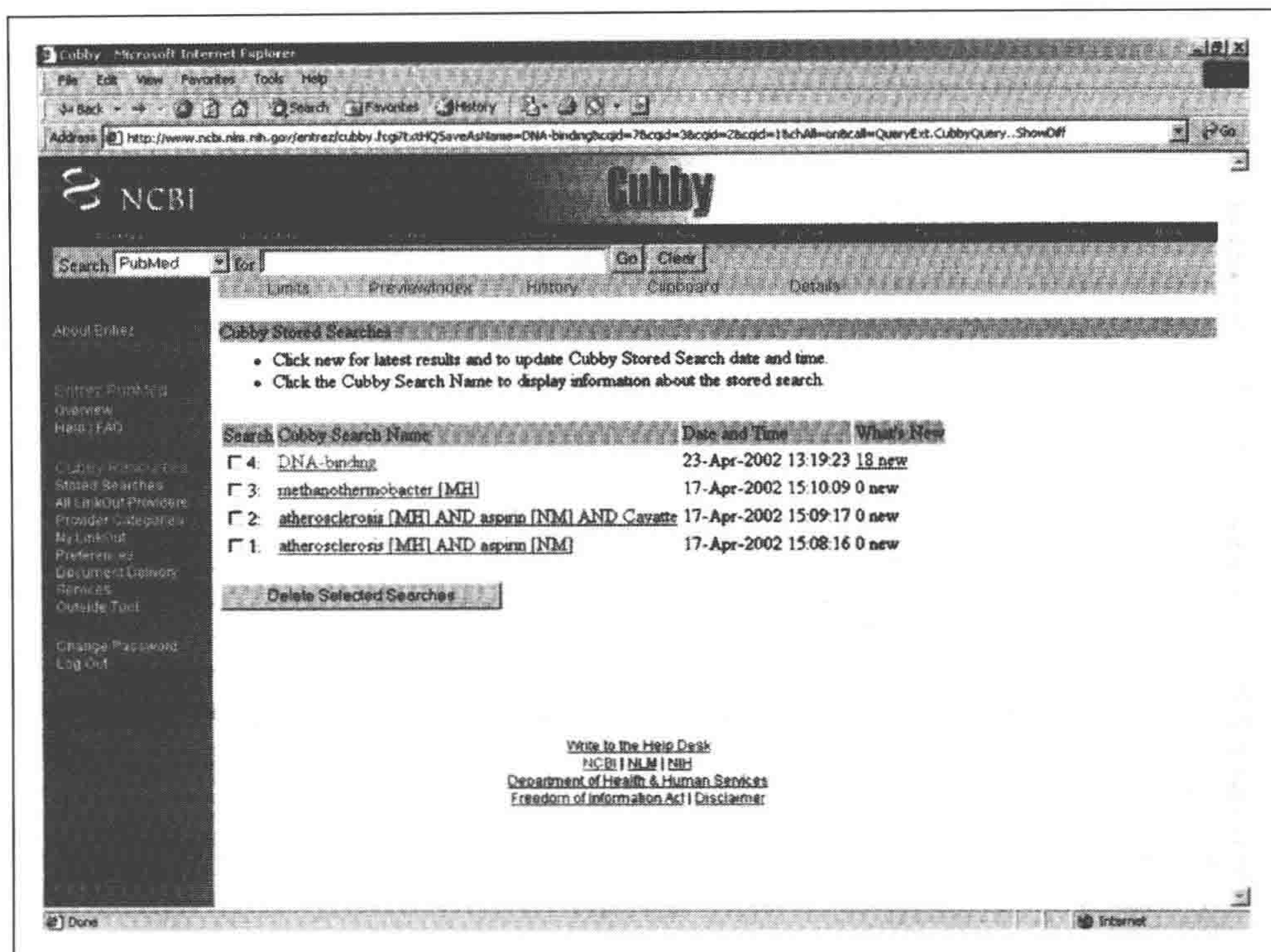


图 6.5.5　自输入最新的查询后，Cubby 更新被储存了的查询条目，并标明新条目的号码。详情见下文描述。

7. 要浏览新的文献，选择 number new 链接（在本例中，cubby 检索条目“DNA-binding”，18new），检索的日期和时间也随着更新为当前的日期和时间。如果该链接没有被选择，检索的日期和时间也就不会被更新。

备选方案　在 Entrez 中进行并联查询

这是一个进行 Entrez 查询的另外一种方法，包括一些系统的 built-in 特征，如用户试图找出甲烷杆菌编码 DNA-binding 蛋白的所有基因。虽然该例子是在核苷酸数据库中检索，但这种策略同样适合在 Entrez 数据库中进行。

材料

一个更新的网址浏览器，如 Netscape Communicator 或者 Internet Explorer

执行并联查询

1. 打开一个网站浏览器，登录到 Entrez 网页（http://www.ncbi.nlm.nib.gov/Entrez,图6.5.1）。在 Search 的下拉菜单中选择 Nucleotide，并在 For 文本框中输入词条 DNA-bingding。点击 Go。
2. 选择直接位于 For 文本框下方的 Limits 超链接，来限制查询的范围。
3. 从 Limited 的下拉菜单中选择 Organism，来限制查询的物种（图 6.5.6）。

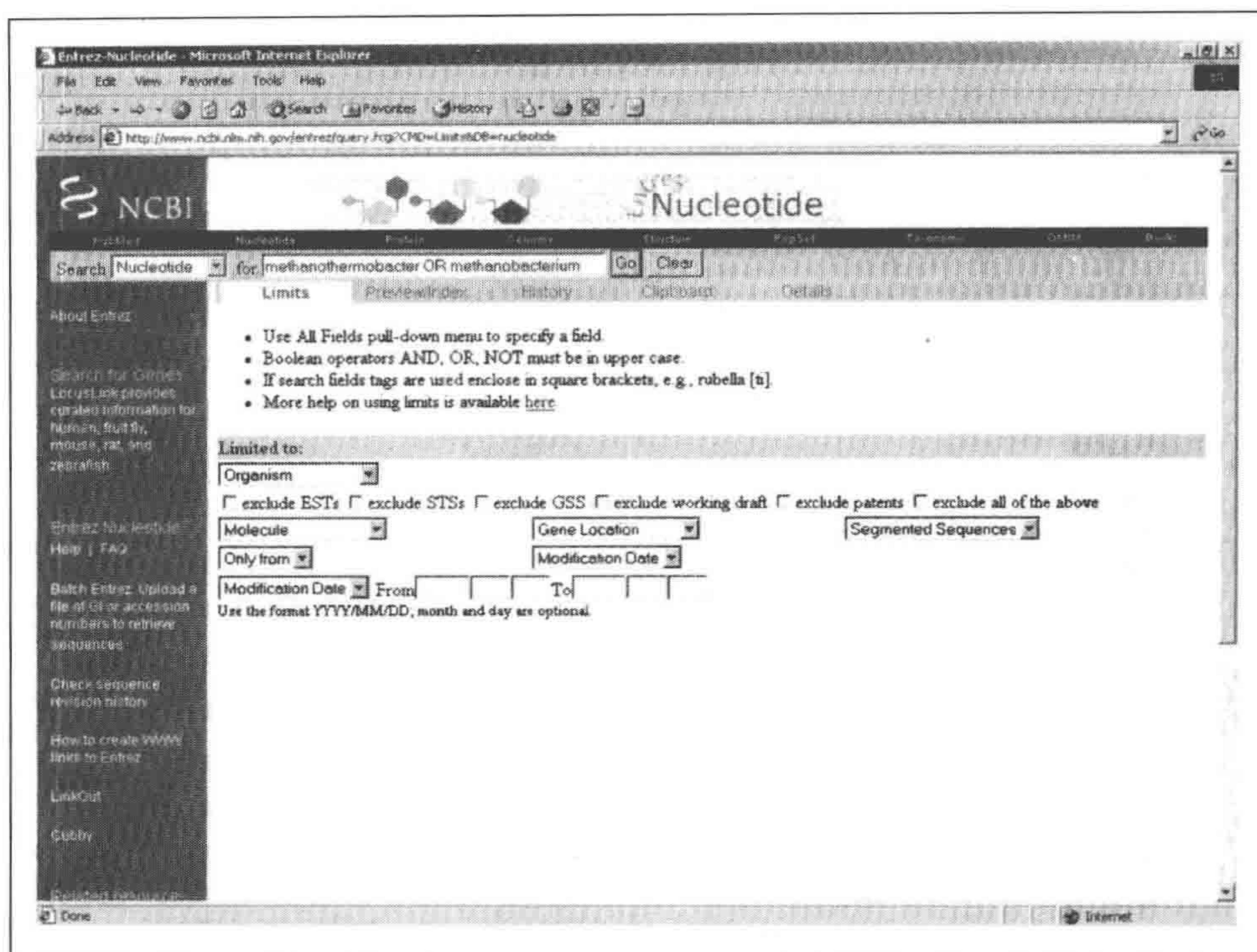


图 6.5.6　使用 Entrez 的 Limits 特征来限制在一个特定的物种中检索。详情见下文描述。

4. 在 For 文本框中输入 methanothermobacter OR methanobacterium（图 6.5.6）。
5. 点击 Go。

合并已选查询

6. 点击位于 For 文本框下方的 History 超链接。History 网页显示用户最近的查询条目（图 6.5.7）。

列出了单个的查询、这些查询是否被加以范围限制、执行查询的时间和单个查询所得到的结果数目。

7. 使用这些查询的查询号来把两个查询合并为一个查询。在 For 文本框中输入 #1AND #2。点击 Preview，可以刷新该表，刷新后显示了新的查询号 #3 来作为刚才合并的查询。此时刷新后的表中包含了三条查询信息。点击 Go 通过核苷酸形式来显示这三条查询信息（图 6.5.8）。如同在基本方案 1 中描述的一样，在每条结果的右上方有一系列的超链接，在本例中的第一条结果，methanobacterium thermoautotrophicum tfx 基因中就有 4 个超链接。

查询与查询结果相关信息

8. 点击 Related Sequences 链接，在核苷酸水平显示与 *Methanobacterium thermoautotrophicum tfx* 基因相似的所有序列。这一操作实质上显示的是一个预演计算的 BLAST 查询结果。

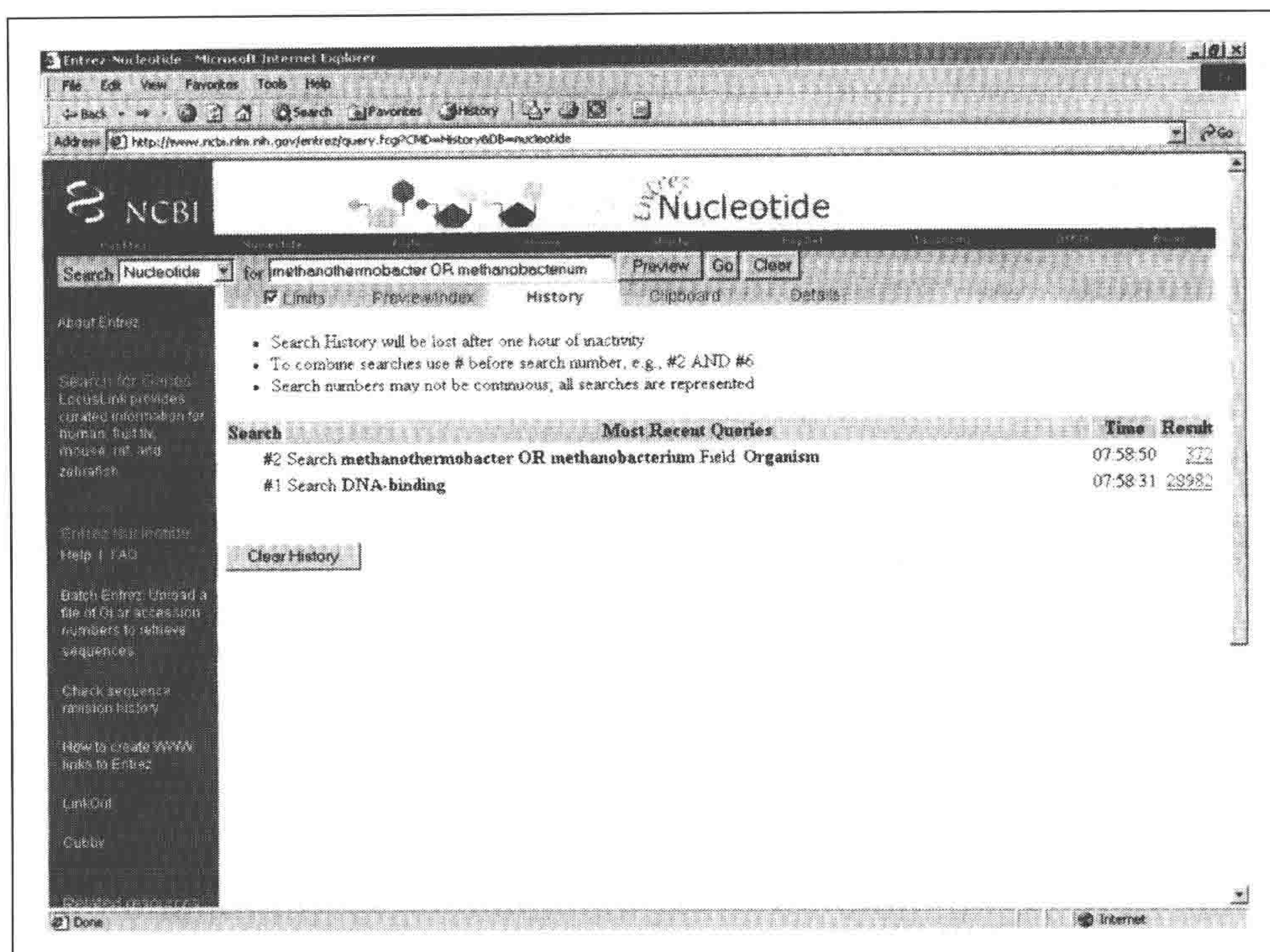


图 6.5.7　使用 Entrez 的 Histroy 特征来并联单个的查询。详情见下文描述。

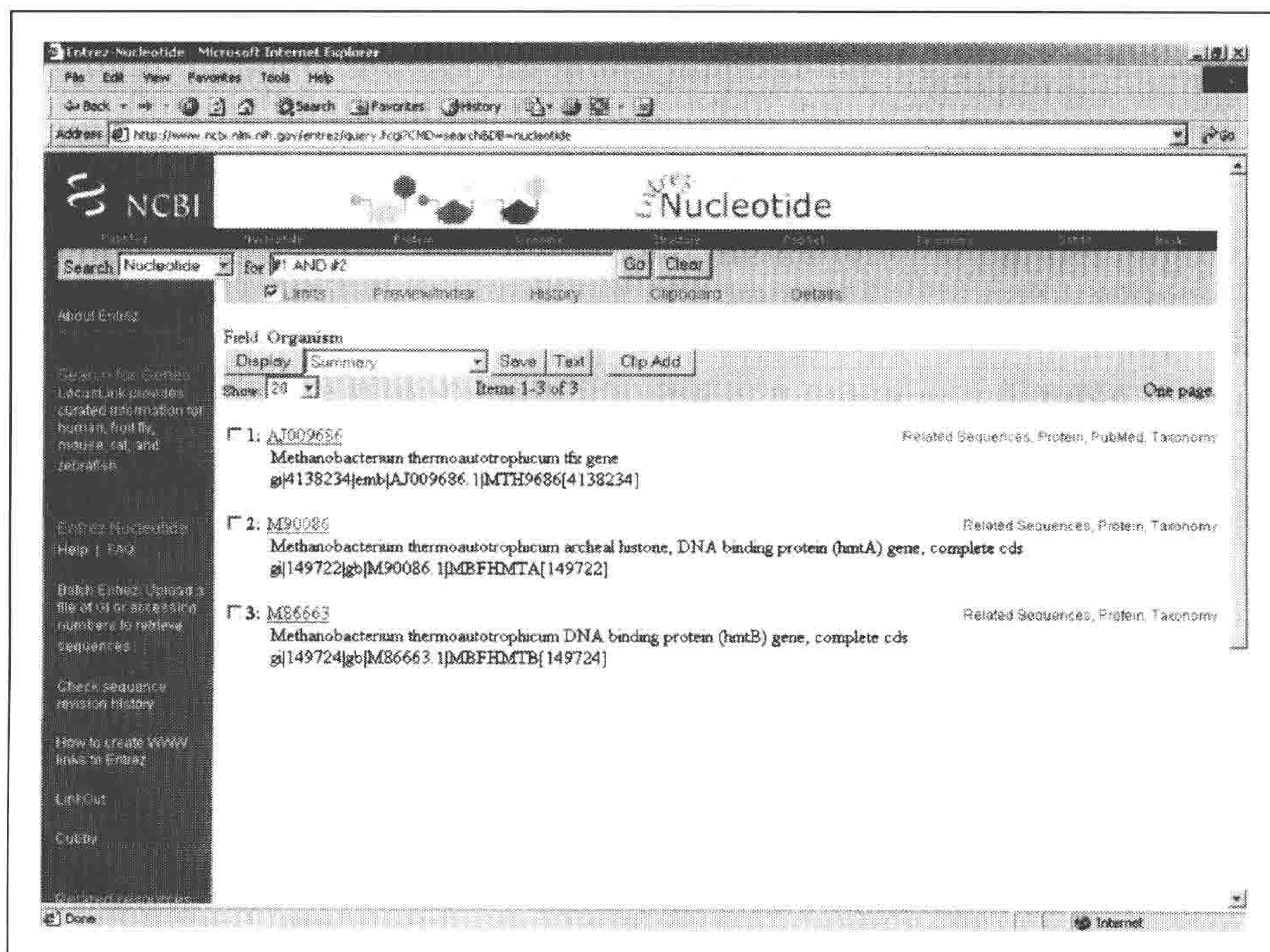


图 6.5.8　并联两个单个查询的查询结果。产生该结果的命令显示在靠近窗口的文本框中。并联的单个结果的信息在图 6.5.6 中可以得到。详情见下文描述。

9. 点击浏览器上的 Back 键，选择 *M. thermoautotrophicum tfx* 基因的 Protein 链接。点击该链接显示 CAA08778，一个 tfx 蛋白。从下拉菜单中选择 GenPept 并点击 Display。GenPept 条目对应 *M. thermoautotrophicum tfx* 基因概念上的翻译显示（图 6.5.9）。

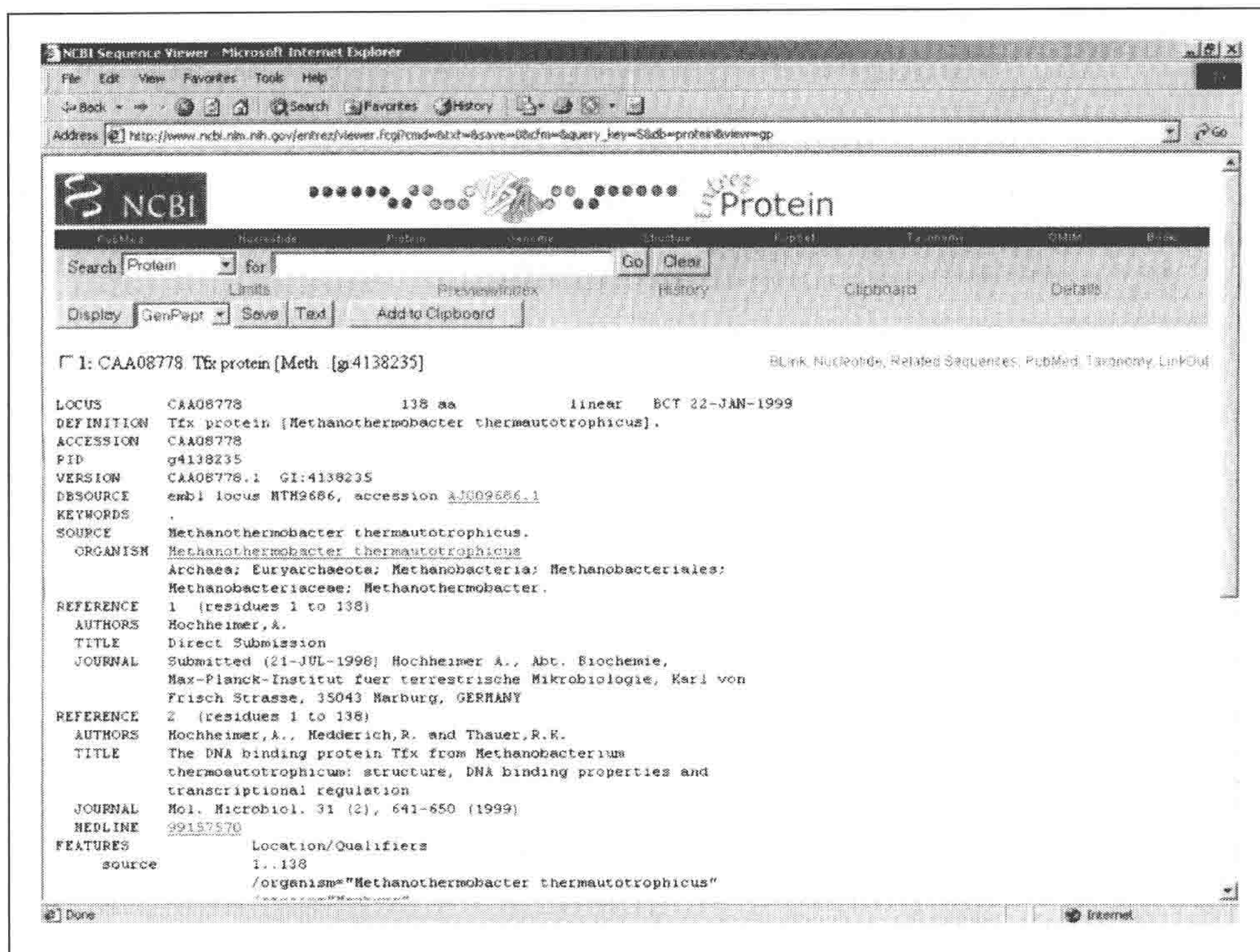


图 6.5.9　*M. thermoautotrophicum tfx* 基因的蛋白质邻域。在图 6.5.8 中点击位于第一个查询结果旁边的 Protein 超链接，用户会得到该 GenPept 结果。详情见下文描述。

值得注意的是，包括条目本身在内，物种科学的命名可以通过超文本形式获得。点击 *M. thermoautotrophicum* 链接显示 NCBI Taxonomy 数据库，该链接能显示出该物种的系谱信息。

10. 回到 GenPept 显示页面（图 6.5.9），并从下拉菜单中选择 Graphics，点击 Display。Graphics 浏览（图 6.5.10）是该水平最有用的浏览之一。该浏览试图用图表的方式显示出条目特征表中描述的所有特征，尤其是当特征表示非常长的时候，提供了一个非常有用的概貌浏览。

11. 点击浏览器中的 Back 键，直到回到 #1 AND #2 查询结果显示的页面（图 6.5.8）。选择 *M. thermoautotrophicum tfx* 基因 PubMed 链接。选择 PubMed 链接能使得用户回到对应 GenBank 条目目录形式显示的条目。

12. 点击浏览器上的 Back 键回到并联查询结果的网页（图 6.5.8），并选择 *M. thermoautotrophicum tfx* 基因的 Taxonomy 链接。选择 *M. thermoautotrophicum* 超文本来显示该基因的生物分类。

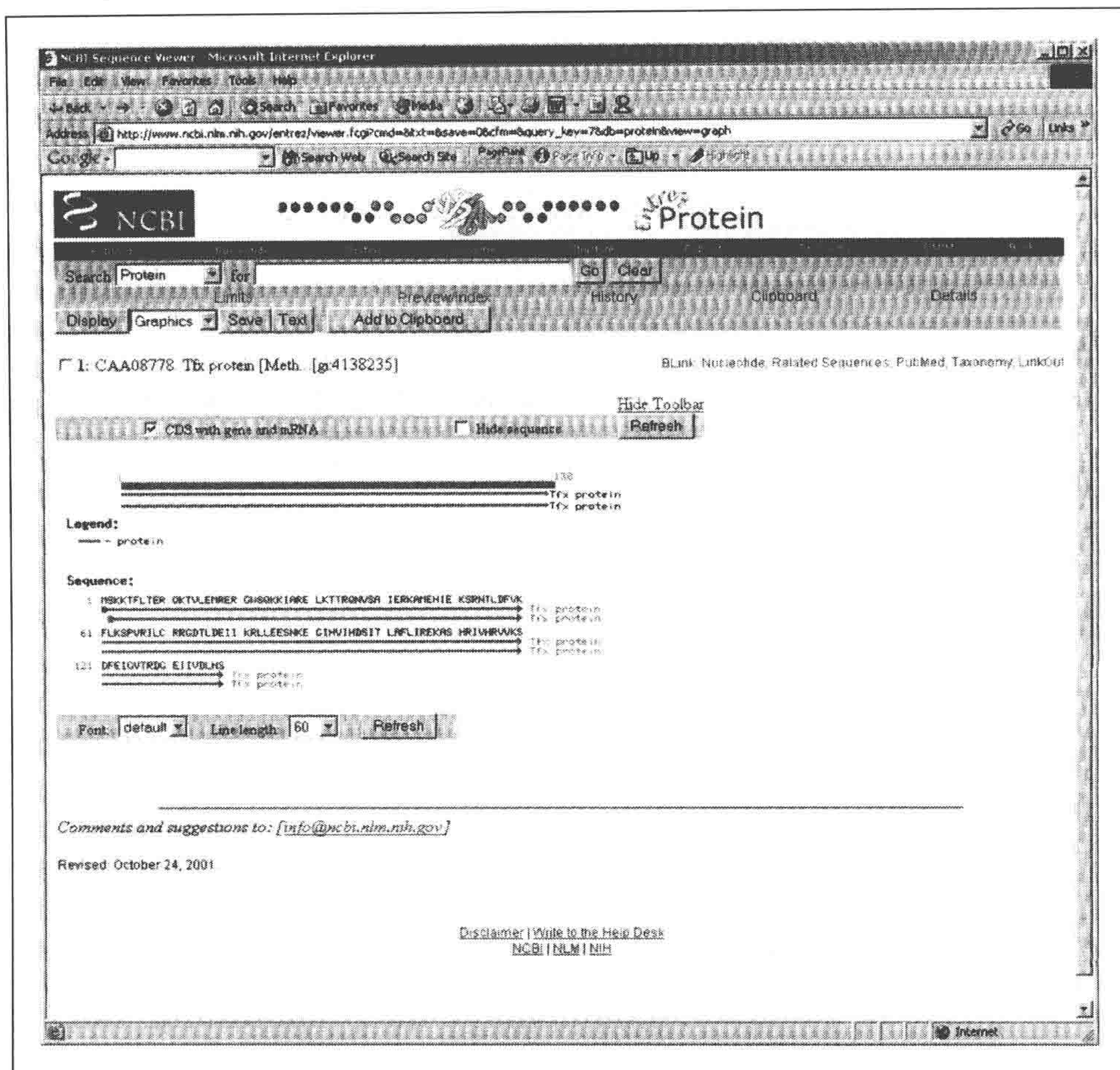


图 6.5.10　*M. thermoautotrophicum tfx* 基因的图谱浏览。

基本方案 2　在 Entrez 中检验结构

下面的例子，假设用户想获得有关小鼠 HMG-box B 的结构信息，它的 PDB 登录号为 1HMF。

材料

一个更新的网址浏览器，如 Netscape Communicator 或者 Internet Explorer

1. 登录到 Entrez 网页（http://www. ncbi. nlm. nib. gov/Entrez 图6. 5. 1）。在 Search 的下拉菜单中选择 Structure，并在 For 文本框中输入词条 1HMF。点击 Go。
2. 点击 1HMF 超文本后，显示结构略图的页面，用户会立刻发现它与其他页面截然不同（图 6. 5. 11）。

   该页面显示来源于 Molecular Modeling Database（MMDB）资源的文档的定义（该资源是从 PDB 衍生来的）、到 PubMed 的链接和到物种资源分类的链接。位于标题下的示意图——一个长度标记为 77 的长条形（代表 77 个氨基酸），用来注释该蛋

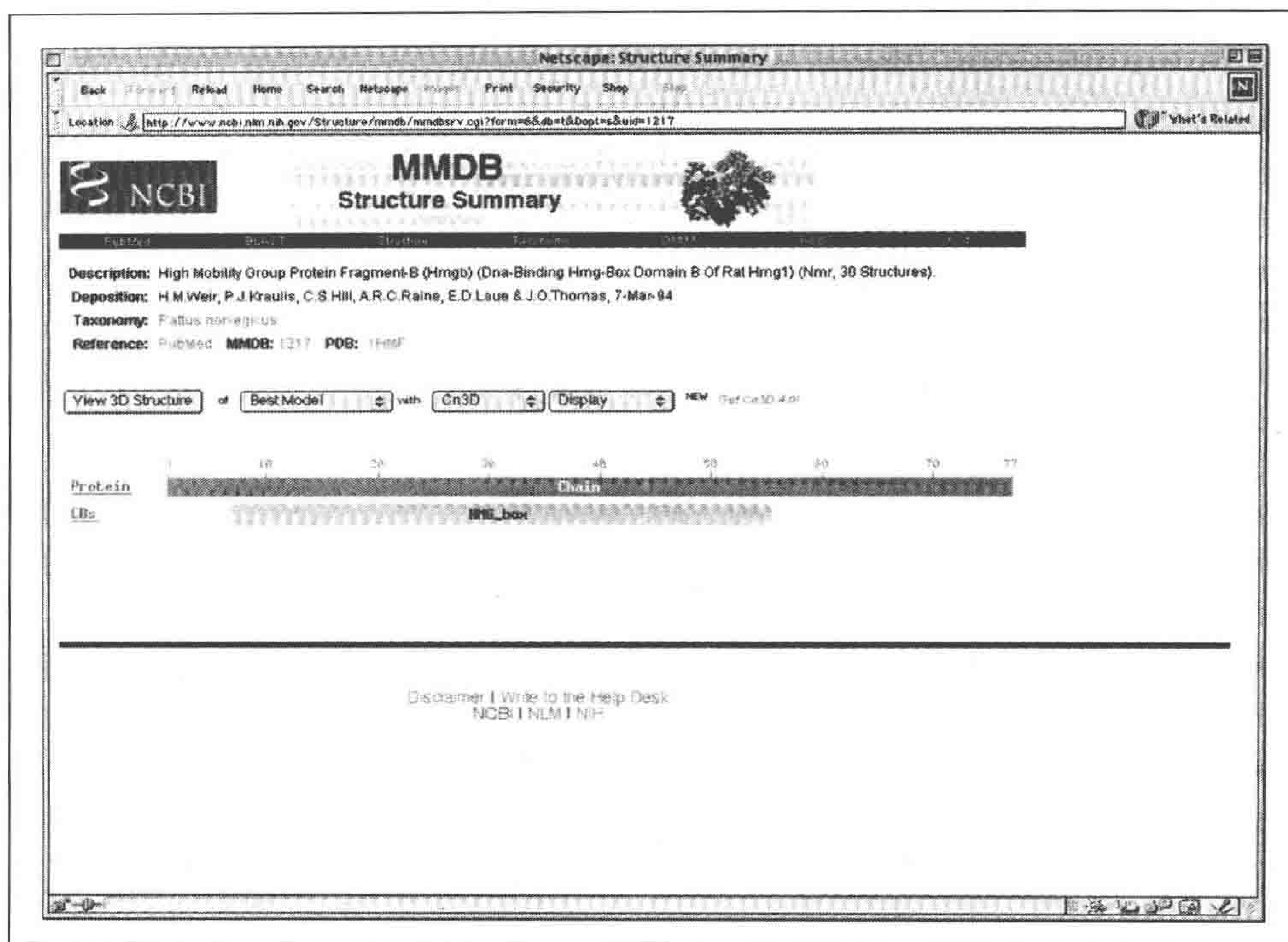


图 6.5.11　1HMF 的结构略图。在 Entrez 系统中直接查询可行的结构后得到的结构略图。结果显示对应 MMDB 结果的标题信息、到 PubMed 的链接和到物种资源分类的链接。

白质。该长条形的下方还有一个条棒状的示意图，该示意图显示了该蛋白质内被定义的功能区域位置（这里指的是 HMG 盒，一个 DNA 结合区域）。

3. 点击上方的长条形对应的是全长的蛋白质。出现页面列出了 4 个邻近区域，这些邻近区域是通过 Vector Alignment Search Tool（VAST）估计出来的。
4. 点击 Get Cn3D 4.0 下载 Cn3D，可以获得关于该蛋白质的三维结构。要显示出该蛋白质的三维结构图必须安装 Cn3D 4.0 程序软件。
5. 一旦安装成功，用户可以点击浏览器上的 Back 键返回到 1HMF 结构摘要的页面，点击 View 3D Structure，一旦 1HMF 三维坐标从 NCBI 服务器上下载完后，会弹出一个 Cn3D 页面。
6. Cn3D 会产生两个窗口，一个显示 1HMF 的结构，另一个显示序列。用户可以在序列窗口中突出显示序列中的任何一段，对应的结构将会在结构显示窗口中以黄色显示出来。用户也可以通过选择 Style > Rendering Shortcuts and Style > Coloring Shortcuts sub-menus 中的选项，来调整蛋白质结构的显示。
7. 可以通过按住鼠标键来旋转蛋白质结构。拖动鼠标时按住 Apple（苹果机，Mac）或者 Command 键（PC 机）来缩放结构图。

参考文献：Altschul *et al.*，1990；Madej *et al.*，1995

编　　者：Juliane Murphy and Andreas D. Baxevanis

第7章 搜寻候选基因突变的方法

对于某一遗传疾病关联的候选基因的鉴定开始了对致病突变的搜寻。当前，随着人类基因图谱的发展和定位克隆技术新方法的应用，可供扫描的致病突变的基因数量显著上升。常染色体显性致病突变通过功能性效应的改变与基因的多态相区分。在家族遗传中，这些突变与疾病的表型有共分离的现象，即未患该类疾病及其相关症状的个体中不存在这些突变。尽管对某类突变的功能性效应的精确描述需要以细致的生物化学和人类及动物模型的研究结果为依据，但是支持突变的疾病病因学假说的证据可以通过对疾病家系与正常人群的遗传学分析中获取。

广义上分，致病突变可以分成两类：一类是导致基因结构的显著变化，如大片段的缺失、插入、倒位或者重复；一类是导致基因结构的细微变化，如小片段的缺失、插入、倒位或者重复及无义突变。这两类突变都包含有显性、隐性及X连锁突变，我们并不能断定一类突变是大片段的缺失或重复，还是单核苷酸的变化。而幸运的是，鉴定基因整体结构突变的方法已经建立。标准化的和特殊的细胞遗传学技术（第4章）可以有效地鉴定整体的染色体结构突变。脉冲电场中的凝胶电泳（单元5.1）、Southern blot杂交（附录3G）和限制性内切核酸酶作图等技术可以得到基因组的组成信息，这些信息可用于鉴定大片段的缺失、插入、倒位或者重复。这些技术的操作方法同时可以在Current Protocol in Molecular Biology（CPMB：Ausubel *et al.*，2004）上找到。这些技术用于cDNA克隆或基因片段克隆是可取的，它们伴随着候选基因点突变分析的开始而应用于实践研究。

对导致基因组结构细微改变的突变的检测需要采取不同的策略。鉴定候选基因中的点突变是一项艰巨的工作。候选基因的大小从几千个到几十万个碱基对，同时编码序列也可以分割成许多个外显子。在大的基因中寻找致病的突变需要在数以千计的核苷酸中鉴定出单核苷酸的改变。更复杂的是，在常染色体显性的情况下，患病个体通常是杂合子显性致病，或者是复合杂合子隐性致病，这时我们对正常和突变序列都要进行检测以发现特定的突变。

本章中所描述的所有方法都是基于通过候选基因或cDNA片段的PCR扩增产生不具有放射活性的扩增DNA的方法之上的。另外，这些扩增片段产生与鉴定的方法在单元7.1中有描述。

单链构象多态性分析（单元7.2、单元7.3）通过在DNA分子产生时发生构象变化的性质检测突变，构象的变化反映到突变DNA相对于正常DNA的电泳迁移率的差异。一些突变改变了DNA分子的构象造成了大幅度的迁移率变化，而其他一些则只有微小的改变。构象变化的部分原因是由发生突变部位的侧翼序列引起的。当一个特定的候选基因可以耐受致病突变时，迁移率的差异增大，突变检测的失败需要批判性的评价。

突变同样可以对PCR扩增的DNA直接测序进行检测。用此方法，每一个从患病个体得到的候选基因外显子都需要PCR扩增和测序（单元7.4）。在过去的几年里，因

为 DNA 测序分析技术有了显著的发展，对患病个体的 DNA 进行 PCR 扩增后直接测序成为了当前突变扫描的有效方法。此方法的首要优势就是可以检测几乎所有的突变。

本书中鉴定无义突变的操作方法允许对长度在 30 000～60 000 个碱基对片段大小的 DNA 在一块胶上进行分析。变性高效液相色谱（DHPLC）可以用来扫描这样大小的 DNA，用时需 12～18h。这些方法对于大的候选基因的快速扫描是适合的。最终，每种方法检测后都对显示有突变的基因区域进行 DNA 测序。循环测序（单元 7.5）为小的 DNA 片段的 DNA 序列的确定提供了方法。有能力对 PCR 扩增的 DNA 片段测序可以显示采用其他方法也能显示出的性质，它还可以用于小片段中突变的直接扫描。

总的说来，本章概述了对患病个体突变检测的几种不同方法。对已经鉴定出来的致病突变用这些方法检测，证明了这些方法的有效性。一个对许多致病突变进行描述的数据库已经建立（单元 7.6）。

编者：J. G. Seidman and Christine Seidman

单元 7.1 患病个体的序列扩增

目标序列在患者样本中存在非常低的拷贝，选用巢式引物用两个连续的循环进行聚合酶链反应（即 PCR）的方法扩增（PCR；CPMB 第 15 章；图 7.1.1）。在许多情况下，编码序列以及内含子侧翼序列中间的间接供体/受体位限制区域是最容易发生突变的，限制在这些区域进行分析的方法是可取的。因为引物序列中的点突变经过 PCR 通常不能检测出来，所以引物需要定位以保证有足够的重叠区域对每个片段末端的突变区域进行检测。内含子序列中最有可能存在非编码的多态，随意把引物定位在 3′端接近外显子/内含子边缘区域是可取的，因为这样可以减少引物中包含的这部分内含子序列情况的发生。

基本方案 1 从淋巴细胞中扩增 RNA

材料（标√的条目参见附录 1）

用 EB 病毒侵袭诱导转化的 B 细胞（附录 3J）或者采用 Ficoll-Hypaque 梯度离心后分离的非转化淋巴细胞（单元 10.3）

√PBS，冰冷

√DEPC 处理过的水

√1.25mmol/L 4dNTP 混合物

√包含有 1.5mmol/L $MgCl_2$ 10×PCR 扩增缓冲液

25mer 寡聚核苷酸引物（图 7.1.1）：外（反和正）引物和内（反和正）引物

RNasin（核糖核酸酶抑制剂）（promega）

逆转录酶［如 Moloney murine leukemia virus（MoMuLV）-RT 莫洛尼（氏）鼠白血病病毒］

Taq DNA 聚合酶（Perkin-Elmer Cetus）

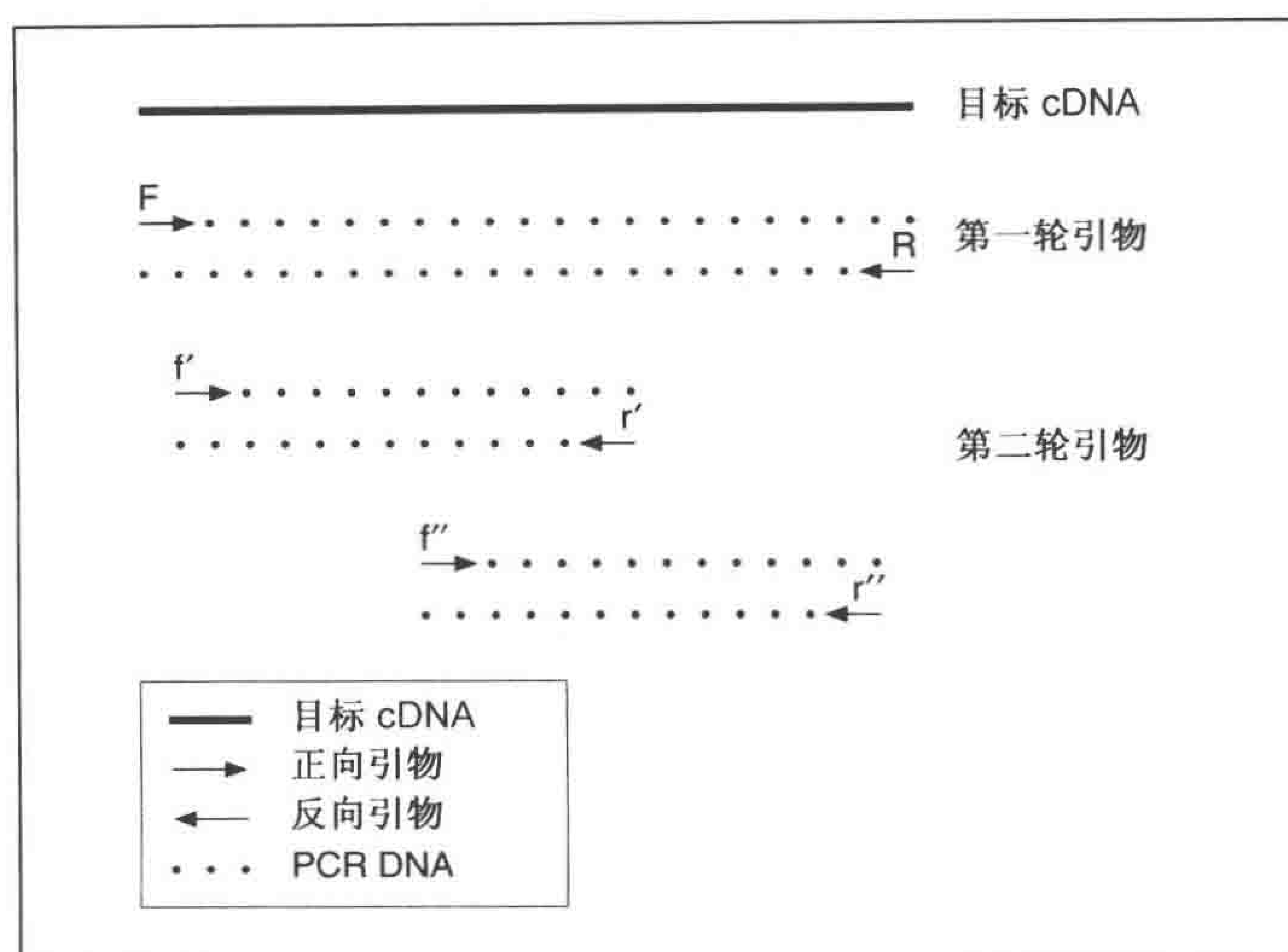


图 7.1.1　使用嵌套引物进行又一轮 PCR 反应。(A) 引物 R 可用于从一个基因模板反转录的 cDNA 中。它也可以用来与底物 F 到产生第一次 PCR 产物。(B) 安排的巢内引物扩增的各个步骤中都可能包含有突变。

矿物油

筛（子）琼脂糖（如 Nusieve，FMC Bioproducts）

DNA 分子大小标准参照物

1.5ml 和 0.5ml 聚丙烯微量离心管，干净并元 RNase

循环变温加热器

42℃水浴

Beckman JS-4.2 转子或等同物

1. 收集转化的 B 细胞，从 30ml 的饱和 EB 病毒培养或梯度离心从 20～30ml 新鲜全血中，利用 ficoll-hypaque（聚蔗糖泛影钠）从非透明的淋巴细胞中提取（这个的总量限制约为 10^9 个细胞）。
2. 用冰冷的 PBS 清洗细胞，300*g* 4℃离心 5min。
3. 利用单步硫氰酸胍法从细胞中提取总 RNA（单元 10.3）。
4. 微量离心管中用 100μl 的经 DEPC 处理的水重悬 RNA，并等分于两个 50μl 的管中于 −70℃下储存（可稳定保存一年以上）。预计 RNA 的浓度应为 1mg/ml（共 100μl）。
5. 在 0.5ml 微量离心管建立如下 20μl 的反应体系：

   2μl 1.25mmol/L 4dNTP 混合物；

   2μl 10×PCR 扩增缓冲液；

   500ng 逆向（反义）外引物（60pmol）；

   20U RNasin；

   2μg（2μl）RNA（第 4 步产物）；

   50U 反转录酶；

   加经 DEPC 处理过的水至 20μl。

在42℃的环境下培养45min。在90℃下加热反转录酶10min。冷却，高速离心。散布控制反应（除了RNA其他条件相同）的测试样本，并在操作过程中的同时进行。扩增前在4℃环境下储存cDAN产物过夜或者储存在−20℃中。

6. 在0.5ml微量离心管建立如下100μl的反应体系：
   16μl 1.25mmol/L 4dNTP混合物；
   2μl 10×PCR扩增缓冲液；
   500ng前外引物（60pmol）；
   20μl cDNA（第5步产物）；
   加经DEPC处理过的水至100μl。
   加2.5U *Taq* DNA聚合酶。混匀，高速离心。如果应用于循环变温加热器则先加2滴矿物油覆盖。
7. 应用如下程序建立PCR反应：

40个循环：	30s	94℃（变性）
	1min	55℃（退火）
	2min	72℃（延伸）
最后步骤：	无定期	4℃（保存）

8. 将10μl第一轮反应的PCR产物加入到1ml的水中。使用5μl这种按1∶100稀释度稀释的溶液作为模板进行第二轮PCR扩增。将第一轮反应的PCR产物和稀释液4℃保存，以备日后需要时使用。
9. 对于每一个样品按照下面的设定在0.5ml的微量离心管中配置成50μl的溶液：
   8μl 1.25mmol/L的4dNTP混合物；
   5μl 10×PCR扩增缓冲液；
   250ng正向引物、250ng反向引物（30pmol）；
   5μl 1∶100稀释度稀释的第一步PCR产物（来自第8步）；
   补水到50μl。
   加入1.25U的*Taq* DNA聚合酶。混合，微量离心机最高速离心，如果热循环装置允许的话在外面涂上矿物油。在平行步骤中对测试样本插入进一步的对照反应（除非没有第一轮反应的相同产物）。
10. 应用如下程序建立PCR反应：

30～40个循环：	30s	94℃（变性）
	1min	55℃（退火）
	2min	72℃（延伸）
最后步骤：	无定期	4℃（保存）

11. 从第2步反应中吸取10μl产物进行琼脂糖凝胶电泳，并用溴化乙锭染色（附录3G）。包括含有一种已知数量的分子大小标记的（电泳）泳道，并进行图像处理。

备选实验方案

改良cDNA的二次扩增

扩增如异源双链分析或化学裂解可能需要5′-^{32}P-标记产物。对于这些扩增，二次

PCR 按描述的那样执行，但是要用末端被标记的引物。这个单个或是双个引物所标记的 5′端，用于 [γ-^{32}P] ATP 存在的 T4 多核苷酸激酶催化的 PCR 反应中。

另外，二次 PCR 可以用于利用包含限制性内切核酸酶的引物，以便得到亚克隆的最终产品，如用于序列测定。酶的切割位点绝不能存在于这个目标 DNA 序列中，并应产生黏性末端使之更有利于克隆到所选择的载体聚合接头上。这两种方法都有必要确保 PCR 产物的高效限制性。第一，寡聚核苷酸引物应该有个从 5′端到酶切位点的三核苷酸残基的"帽"结构（即其自身 5′端到目的 DNA 序列）。第二，由于 PCR 反应有产生不完全末端的趋势，二次 PCR 的产物必须被冈琦片段填充，以确保酶切位点的产生。

基本方案 2　基因组 DNA 的扩增

材料（标√的条目参见附件 1）

　基因组 DNA（附件 3A）
√1.25mmol/L 4dNTP 混合物
√包含有 1.5mmol/L $MgCl_2$ 10×PCR 扩增缓冲液
　寡聚核苷酸引物：正、反引物
　Taq DNA 聚合酶（Perkin-Elmer Cetus）
　矿物油
　筛（子）琼脂糖（如 Nusieve，FMC Bioproducts）
　DNA 分子大小标准参照物
　1.5ml 和 0.5ml 聚丙烯微量离心管，干净并无 RNase
　循环变温加热器

1. 稀释每个 DNA 样本到用于分析的 100ng/μl，并 95℃加热变性 5min，于 4℃储存。
2. 对于每个样本而言，在 0.5ml 微量管中建立如下的 50μl 的反应体系：
   8μl 1.25mmol/L 4dNTP 混合物；
   5μl 10×PCR 扩增缓冲液；
   上下引物各 250ng；
   200ng DNA 基因（从第 1 步中的样本加 2μl）；
   50μl 无菌水。
   再加入 1.25U *Taq* DNA 聚合酶。混合，离心，如果是适合加热周期模式，表面加上矿物油。散在控制反应（除了 DNA 的缺失要识别反应）和同步进程。
3. 取出 PCR 使用如下的扩增循环：

30 个循环：	30s	94℃（变性）
	1min	55℃（退火）
	1min	72℃（延伸）
最终步骤：	无定期	4℃（保存）

4. 从每一个第二轮反应中，在用 EB 染色的琼脂糖凝胶上（附录 3 G）电泳 10μl。包括一条含有已知数量的分子大小标准。

编者：Hugh C. Watkins

单元 7.2　通过单链构象多态性分析检测基因突变

基本方案

材料（标√的条目参见附录 1）

PCR 引物 A 和 B（$1OD_{260}$/ml；正向和反向引物被设计和扩增<220bp 的感兴趣的 DNA 片段

5U/μl T4 多核苷酸激酶和 10×缓冲液（附录 3E）

10mCi/ml [γ-^{32}P] ATP（3000Ci/mmol；Amersham）

√2mmol/L 4dNTP 混合液

5U/μl *Taq* DNA 聚合酶

√10×PCR 扩增缓冲液

25～250μl/ml 人类基因组 DNA 的影响，并不会影响个人（单元 7.1）

矿物油

低胶凝/熔点琼脂糖（如 NuSieve GTP 琼脂糖，FMC 生物产物）

2%二甲基二氯硅烷（BDH 诊断；室温储藏）

√50%（*m*/*V*）丙烯酰胺原溶液

√10×TBE 缓冲液

10%（*m*/*V*）过硫酸铵（APS；现用现配）

TEMED

0.1%（*m*/*V*）SDS/10mmol/L EDTA（pH 8.0）

√2×甲酰胺加载缓冲液

65℃水浴

循环变温加热器

DNA 序列凝胶仪器，31cm×38.5cm 玻璃杯，0.4mm 间隔顺序和 sharkstooth 探针

防水带

90℃热阻断

Whatman3MM 滤纸

UV 透明塑料带（如 Saran 带）

1. 标记 PCR 引物 A 和 B，用如下方式混合（足量的 20 只 PCR 管）：

5μl 1 OD_{260}/ml PCR 引物 A；

5μl 1 OD_{260}/ml PCR 引物 B；

5μl 10×T4 多核苷酸激酶缓冲液；
5～10μl [γ-^{32}P] ATP（50～100μCi）；
2μl 5U/μl T4 多核苷酸激酶 ；
加水至 50μl。
37℃孵（化）30～60min。在 65℃加热 10min 使酶失活（附录 3E）。
PCR 的产物能直接被添加的 0.1μCi [α-^{32}P] dCTP 所标记，对于每个 PCR 反应体系，未被标记的正常使用的 dCTP 减少 1/10，凝胶也将可能被银染。

2. 准备一份 20 个反应的 PCR 混合物（总共 960μl）：
100μl PCR 引物 A；
100μl PCR 引物 B；
100μl 2 mmol/L 4dNTP 混合物；
100μl 10×PCR 扩增缓冲液；
4μl 5U/μl *Taq* DNA 聚合酶；
506μl 水；
50μl 标记引物混合物（第 1 步）。

混合均匀，分装到 20 只管内，每管 48μl，每管加入 2μl 样本 DNA（50～500ng）。再加入 3 滴矿物油，调节好扩增用的合适的循环温度条件，如果可能的话，用一种已知的正常个体的 DNA 来控制反应。已知个体在靶序列中携带一个突变（单元 7.1）。

PCR 的产物能直接被代替 2μl 10mCi/ml [α-^{32}P] dCTP 和 44μl 水的 50μl 标记的引物混合物所标记。

3. 证实扩增的靶序列分析，通过 5～10μl 的 PCR 产物，在 2%～3%微型胶取得低胶凝/熔点琼脂糖凝胶上。
4. 用洗涤剂、水和乙醇玻璃板彻底清洗。用 2%二甲基二氯硅烷处理一板：小心地用薄膜与 Kimwipes 纸巾与二甲基二氯硅烷滋润，允许薄膜干燥，用乙醇擦拭。插入间隔物，并封闭两边和底部防水胶带。
5. 准备凝胶的办法。4.5%（0.4mm 厚）nondenaturing 聚丙烯酰胺凝胶，混合：
6.3ml 50%（或者更高）聚丙烯酰胺储存液；
3.5ml 10×TBE 缓冲液；
59ml 水。

去除毒气，然后加 1ml 10%的 APS ，混合均匀，加 50μl TEMED，再次混合均匀。必要的话，加入 5%或 10%（*V/V*）的甘油，混合凝胶，以改善实验方案，不要使用变性剂，如尿素。

6. 立即灌胶，轻弹胶板赶走气泡，把梳齿插好，水平静置至少 45min 以使其聚合。对于鲨齿梳，应将齿向上插入，形成一个单一的、胶宽度的孔。

胶浓度的均匀是很重要的，在边缘和中间支撑垫平胶板，以确保胶的浓度均匀。

7. 冷却胶，0.5 缓冲液储存于 4℃槽中。
8. 从胶的底部移去夹子和胶带，移去梳齿。把胶板链接到测序仪上。对于鲨齿梳，用向下的齿替换原来向上的齿，并使其刚好接触胶的表面。加入 0.5×TBE 到顶和底的槽子中。用带针的注射器从胶的底部冲洗胶孔和气泡。

9. 用 0.1% SDS/10mmol/L EDTA（pH8.0）将 PCR 产物稀释 10 倍。将 10μl 稀释后的样品和 2× 甲酰胺上样缓冲液混合。90℃加热 3min。然后立即转移到冰上，以防止 DNA 链再退火。也可以在加热前，直接加两体积的甲酰胺上样缓冲液到完全的 PCR 混合物中，或者直接从 90℃加热模块加载 PCR 样。
10. 立即加入 2～5μl 各种 PCR 样品。其他泳道包括 PCR 放大的阳性和阴性对照 DNA 和非变性 PCR 产物（用来指示胶上双链 DNA 的位置）。电泳，溴酚蓝刚跑出胶的底端时停止。典型的是在 30W，4℃条件下电泳 2～4h，也可以在低压（如 6W）室温下电泳过夜。

    含有甘油的胶一般电泳得更慢。含有 10%甘油的 6%的丙烯酰胺凝胶最适合在 6～8W 下电泳过夜。
11. 电泳后，切断电源，将胶从仪器上取下来。把胶带从边上取下来，把胶放平。拆开胶板（胶应该粘在其中的一块板子上），把胶移到一张 Whatman 3MM 纸上，并用塑料罩盖好。在 80℃凝胶干燥器中干燥 45min。
12. 室温下不用增强屏，放射自显影 4h 到一夜。

参考文献：Spinardi *et al*.，1991

编者：William Warren，Eivind Hovig，Birgitte Smith-Sorensen，and Anne-Lise Borresen

单元 7.3　毛细管电泳法分析单链构象多态性

单链构象多态性（SSCP）是最常用的突变检测方法之一（单元 7.2）。应用毛细管电泳法，通过 DNA 在非变性聚合物中被分离，可以区分野生型和突变型 DNA 片段。通过给每条链贴上不同的标签可以区分两条链（图 7.3.1）。构象是温度决定的，因此，凝胶电泳时要在不同的温度下以实现一个高敏感性。表 7.3.1 列出了许多存在的问题和可能的解决方案。

表 7.3.1　故障排除

问题	可能原因	解决方法
在 PCR 产物中的一些 DNA 片段	非特异性 PCR	通过改变退火温度或 $MgSO_4$ 的浓度或设计一对新的引物来优化 PCR 条件
没有可检测到的信号	电流被气泡或者凝结的毛细管阻断了	检查是否有气泡阻断更换毛细管
在内标中有峰的扩展	分辨率低	在一个新的毛细管中重新跑胶
样品信号太低	PCR 产物少	用更长的链接时间重新链接应用更多的样品
样品信号太强	PCR 产物太多	用更短的链接时间重新链接稀释样品
后链接的峰比先前链接的峰弱得多	样品变性（这可以从长的 PCR 片段——1.2kb 中观察出）	重新变性和冷却

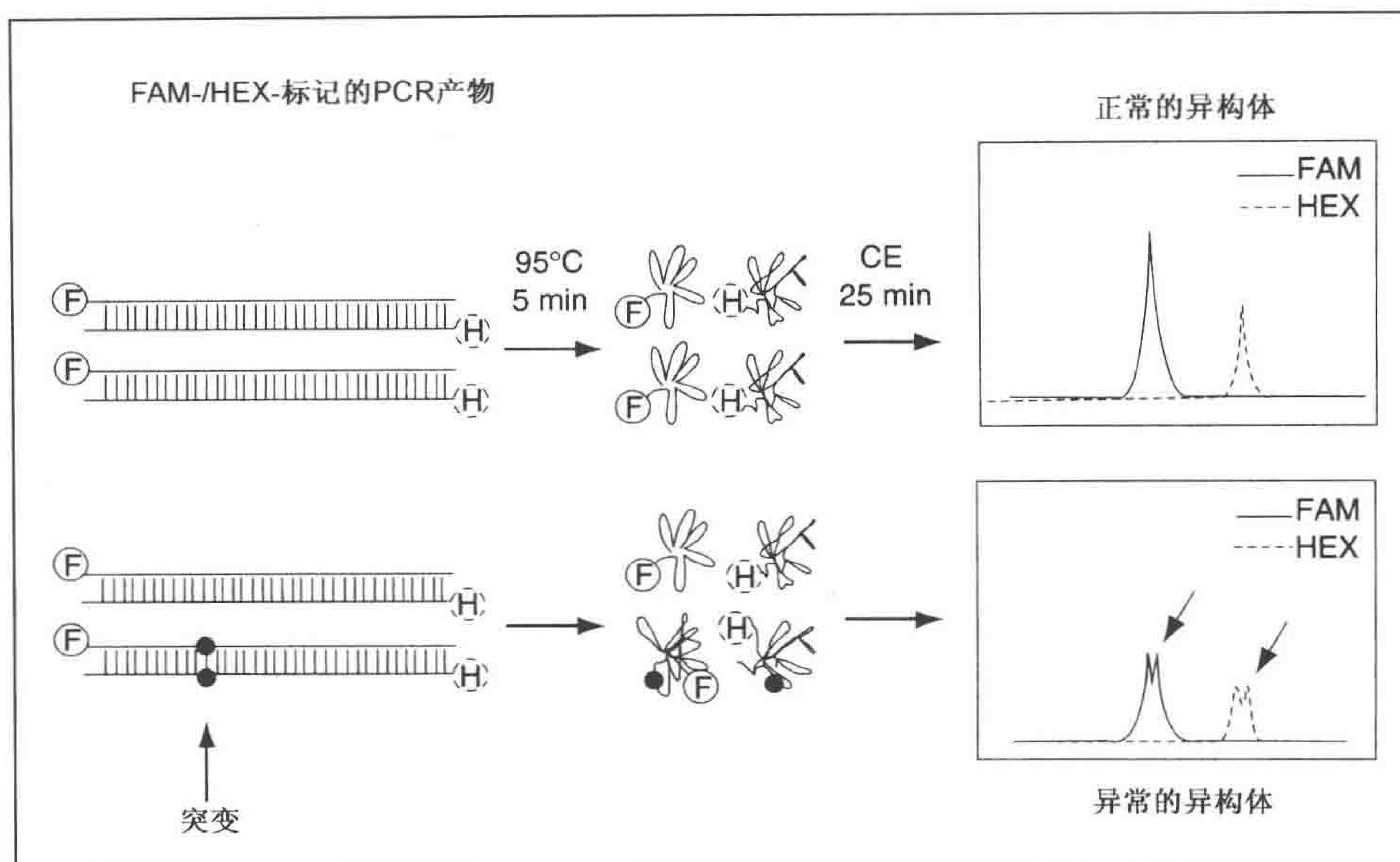


图 7.3.1　检测原理的代表性示意图。DNA 片段被具有荧光引物的 PCR 扩增出来。使被标记的片段变性并且冷却至 4℃。用非变性毛细管电泳分离出单链 DNA 片段。当 DNA 片段进入到非变性的环境中时就会折叠成序列特有的二级或三级结构。突变的片段由于异常的构象的不同移动，会在电泳图谱中显示不同的峰值。

基本方案 1　毛细管电泳的样品准备

材料（标√的条目参见附录 1）

5′-FAM 荧光素标记的正向引物（如 MWG-Biotech）
5′-HEX 荧光素标记的反向引物（如 MWG-Biotech）
√dNTP（每种 10mmol/L）
10×PCR 缓冲液（Roche Diagnostics 公司）
Pwo DNA 聚合酶（Roche Diagnostics 公司）
Milli-Q 系列超纯水
25mmol/L $MgSO_4$
2%（*m*/*V*）　琼脂糖凝胶
7%（*V*/*V*）基因扫描胶（Applied Biosystems）
10×有 EDTA（Applied Biosystems）或 TBE（附录 1）的遗传分析仪缓冲液
87%（*V*/*V*）甘油溶液（Merck）
去离子甲酰胺
0.3mol/L NaOH
DNA 大小标准品（如分子质量内标，分子质量 500，红色标记，Applied Biosystems）
计算 T_m 的软件（如 AnnHyb，http://annhyb.free.fr/；或 Oligo，Molecular Biology

Insights；可选）

0.2ml PCR 管

热循环器（如 PTC200 DNA engine，MJ Research）

50ml 聚丙烯管

ABI PRISM 遗传分析仪（Applied Biosystems）

1. 计算 PCR 引物的理论 T_m 值。用软件或通用的标准计算。用下面的退火温度：T_m（理论）－5℃。
2. 准备 5 个 25ml 的 PCR 反应体系，在冰水混合物中混合下列物质（乘以 5）：

   1.25μl 20μmol/L 5′FAM 荧光素标记的正向引物（最终稀释为 1μmol/L）

   1.25μl 20μmol/L 5′HEX 荧光素标记的反向引物（最终稀释为 1μmol/L）

   0.5μl（每种 10mmol/L）dNTP（最终稀释为 200μmol/L）

   2.5μl 10×PCR 缓冲液（最终稀释为 1×）

   0.1μl 5U/μl *Pwo* DNA 聚合酶（最终稀释为 0.5U/25μl）。
3. 准备 5 个 0.2ml PCR 管，在冰水混合物中将下列物质分别加入到标记的管中。

   a. 1μl 20～60ng/μl 基因组 DNA，17.9μl milli-Q 系列超纯水，0.5μl 25 mmol/L $MgSO_4$；

   b. 1μl 20～60ng/μl 基因组 DNA，17.4μl milli-Q 系列超纯水，1.0μl 25 mmol/L $MgSO_4$；

   c. 1μl 20～60ng/μl 基因组 DNA，16.9μl milli-Q 系列超纯水，1.5μl 25 mmol/L $MgSO_4$；

   d. 1μl 20～60ng/μl 基因组 DNA，16.4μl milli-Q 系列超纯水，2.0μl 25 mmol/L $MgSO_4$；

   e. 1μl 20～60ng/μl 基因组 DNA，15.9μl milli-Q 系列超纯水，2.5μl 25 mmol/L $MgSO_4$。
4. 加 5.6μl 的 PCR 反应混合物到每个 0.2ml 的 PCR 管。制冷。保存在冰水混合物中。
5. 用下面设定程序的热循环仪扩增 DNA 片段。

1 个循环：	4min	94℃（变性）
34 个循环：	20s	94℃（变性）
	20s	x℃（理论 T_m 值－5℃；退火）
	40s	72℃（延伸）
1 个循环：	7min	72℃（延伸）

   将热循环仪的盖子打开启动热循环仪，在热盖的温度＞85℃时，尽快将 PCR 管从冰水浴中转移到热盖上。关上热循环仪的盖子。
6. 用 2%的琼脂糖凝胶通过琼脂糖凝胶电泳分析 10μl PCR 产物（附录 3G），选择能够使正常片段大小的带清晰显现的 $MgSO_4$ 浓度。
7. 准备 48 个 25μl PCR 反应体系。在冰水浴中混合下列物质：

   1.25μl 20μmol/L 5′FAM 荧光素标记的正向引物（最终稀释为 1μmol/L）；

   1.25μl 20μmol/L 5′HEX 荧光素标记的反向引物（最终稀释为 1μmol/L）；

0.5μl（每种 10mmol/L）dNTP（最终稀释为 200μmol/L）；
2.5μl 10×PCR 缓冲液（最终稀释为 1×）；
0.5～2.5μl 25mmol/L $MgSO_4$（最终稀释为 0.5～2.5mmol/L）；
15.9～17.9μl milli-Q 系列超纯水；
0.1μl 5U/μl *Pwo* DNA 聚合酶（最终稀释为 0.5U/25μl）。

混合好后，分装 24μl 到 0.2ml PCR 管中，加 1μl 20～100ng 基因组 DNA，保存在冰中。

8. 以第 5 步设定好的温度用热循环仪扩增 DNA 片段。

将热循环仪的盖子打开启动热循环仪，在热盖的温度>85℃时，尽快将 PCR 管从冰水浴中转移到热盖上。关上热循环仪的盖子。

9. 用 2%的琼脂糖凝胶通过琼脂糖凝胶电泳分析 10μl PCR 产物（附录 3G）。
10. 将下列物质加入到 50ml 聚丙烯管中：

3.56g 7%基因扫描胶；
500μl 10×带有 EDTA 或 TBE 的基因分析缓冲液；
287μl 87%甘油。

11. 混合 1μl PCR 产物（0.1～0.5μg/μl DNA）、10μl 去离子甲酰胺、0.5μl 0.3mol/L NaOH 和 0.5μl DNA marker。
12. PCR 产物在 95℃变性 5min，将混合物冷却至 4℃（或者变性后转入到冰水混合物中）。

基本方案 2　应用 ABI 310 基因分析仪的自动化毛细管电泳

对于低通量的单链构象多态性（SSCP）分析，一个单独的毛细管电泳仪器，如 ABI 310 基因分析仪（Applied Biosystems）或者 P/ACE 5510（Beckman Coulter）常常就足够了。因为在一个序列特异性的方法里异常的构象异构体的表现取决于温度，所以分析必须在不同的温度下进行。事实上一些突变只会在特定的温度下才会显示其异常的构象异构体。最后，可能会用到一种简单的冷凝物（Larsen *et al*.，1999）。

材料

PCR 产物（基本方案 1）
加了 5%甘油的 5%非变性引物（基本方案 1，第 10 步）
混合了 EDTA 的 10×基因分析仪缓冲剂（Applied Biosystems）
Milli-Q 级别的超纯水
ABI PRISM 310 基因分析仪（Applied Biosystems）
50μm i.d. 的基因分析仪毛细管（Applied Biosystems）
基因扫描分析软件（Applied Biosystems）
基因分型软件（可选，Applied Biosystems）

1. 将 PCR 管放在样品槽上。参照制造商的说明书将 ABI PRISM 基因分析仪调至正常状态。安装一个 50μm i.d. 的基因分析仪毛细管，使距离探头 36cm。在吸管里装上

5%非变性引物，并且在缓冲腔内加入1×基因分析仪缓冲剂。准备样品板。

如果在5%非变性引物中使用了TBE缓冲剂，那么必须用1×TBE代替1×基因分析仪缓冲剂。

2. 在15℃、25℃和35℃运行毛细管电泳，使用以下参数。

   加入时间：15s

   加入电压：15kV

   运行电压：13kV

   运行时间：20min

   使用设置为D的滤光镜检测FAM、HEX、ROX指示。

   如果安装了冷凝板，就必须降低室温以避免凝聚的水，因为它会导致短路并可能损毁设备。由于电泳时使用了高电压，如果开门使用此设备时一定要谨慎。

3. 根据制造商说明书使用基因扫描分析软件分析结果。对每一个电泳温度设定一个大小标准。这些标准里的峰值是由扫描点除以10来确定的（扫描点为3550的峰值是355）。使用DNA固有的大小标准来校准这些峰值。将未知样本与具有已知DNA序列的正常样本比较。另外，也可以根据制造商说明书使用基因分型软件执行自动化数据分析。
4. 用未标记的引物再次放大具有分离的峰值或异常的色移的样本，并且通过DNA测序检测突变。

基本方案3　应用ABI PRISM 3100基因分析仪的自动化毛细管芯片电泳

对于中到高通量的SSCP分析，一个多毛细管的电泳设备如ABI PRISM 3100基因分析仪就是一个很好的选择。为了获得较高的检测率（90%），需要在三个温度下进行SSCP分析。

材料

PCR产物（基本方案1）
加了5%甘油的5%非变性引物（基本方案1，第10步）
混合了EDTA的10×基因分析仪缓冲剂（Applied Biosystems）
Milli-Q级别的超纯水
ABI PRISM 3100基因分析仪（Applied Biosystems）
36cm的基因扫描毛细管芯片（50μm i. d.；Applied Biosystems）
基因扫描NT版本3.7（Applied Biosystems）
基因分型NT版本3.7（可选，Applied Biosystems）

1. 安装一个16通道的芯片（50cm i. d.）使之与探头距离36cm。根据制造商说明书将设备做好正常运行的准备。吸管内吸入5%非变性引物，在缓冲腔内注入1×基因分析仪缓冲剂。准备样品板。将管放入样本槽。
2. 在18℃、25℃和35℃运用三种运行组件运行毛细管电泳，使用以下参数。

加入时间： 10s

加入电压： 3kV

运行电压： 53kV

运行时间： 25min

使用设置为 D 的滤光镜检测 FAM、HEX、ROX 指示。

3. 根据制造商说明书使用基因扫描分析软件分析结果。对每一个电泳温度设定一个大小标准。这些标准里的峰值是由扫描点除以 10 来确定的（扫描点为 3550 的峰值是 355）。使用 DNA 固有的大小标准来校准这些峰值。将未知样本与具有已知 DNA 序列的正常样本比较。另外也可以根据制造商说明书使用基因分型软件执行自动化数据分析。
4. 用未标记的引物再次放大具有分离的峰值或异常的色移的样本，并且通过 DNA 测序检测突变（单元 7.5）。

参考文献：Larsen *et al*.，1999；Walz *et al*，2000

编者：Lars Allan Larsen，Michael Christiansen，Jens Vuust，and Paal Skytt Andersen

单元 7.4 应用基于荧光的自动化测序进行杂合体检测

无论是鉴别常染色体显性异常的病理学突变还是鉴别常染色体隐性和 X 连锁的携带者，其最终的关键步骤是在序列级别上识别其突变。另外，对快速增长的单核苷酸多态性（SNP）方面搜集的资料的鉴别需要一种对杂合子序列变异进行鉴别的方法。这种鉴别现在正被用于大量人口复杂遗传性状的研究。几个不同的故障排除的注意事项被罗列在表 7.4.1 之中。

表 7.4.1 荧光测序的故障指导

问题	可能原因	解决方法
基本的测序过程		
低质量序列	PCR 扩增子效能低或不明确	设计更好的引物，优化 PCR 反应条件
	引物问题	设计内引物用于测序
	模板或引物浓缩不当	调整浓缩手段
	污染问题	使用凝胶纯化
	不可识别	重复序列（有可能再次得到相同的结果）
不能与 GAP4 中的保守序列相比对	保守序列含有空白	编辑末端：编辑以前的文件，查找是否存在插入或缺失
无法使用 Sequencher 进行序列比对	干扰末端或有插入/缺失	用“交互比对”命令，查找是否存在插入/缺失，修理末端
可见单项突变	化学测序结果的峰值可变性	用其他方法确认（限制酶消化、特异性等位基因杂交、HD、DGGE、SSCP 或 DHPLC）用其他化学方法重复进行序列分析

续表

问题	可能原因	解决方法
	人为干扰	同上，在加上重复进行对照实验
非测序方法可见突变不能用测序方法检测到	嵌合	分离突变条带，重复进行扩增和测序
	引物附近的序列变异	引物附近的序列注解是困难的，并且可以通过旋转过滤柱改进
大量测序过程		
高背景	PCR 产物量低	优化引物/PCR 反应条件
	测序时非特异性引导	使用其他引物或设计一个测序引物
	模板量不足	增加 PCR 产物上样量
色谱图扫描终止早色谱过富	测序反应循环中模板量过多	调整 PCR 模板量
扫描结果突然无法解释	引导错误	检查 PCR 产物的非特异性条带
	重复序列	试从另一方向测序
	缺失/插入	试从另一方向测序
		用其他方法确认
波形模糊或重叠	模板量不足	增加 PCR 产物上样量
	人为使毛细管不正常	重复反应或试从另一方向测序
四种颜色结合在同一位置	认为操作时毛细管灌入气泡	重复反应或从另一方向测序

基本方案　通过测序扫描识别杂合突变

材料（标√的条目参见附录 1）

2.5～25ng/μl 基因组 DNA（分离自外周血）溶于 TE 缓冲液，pH7.4

√TE 缓冲液，pH7.4

寡核苷酸引物（Resesrch Genetics）

　250μmol/L 储存液溶于 TE 缓冲液，pH7.4

　10μmol/L 储存液，溶于水（去离子，经蒸馏并自动分流的）

√10×PCR 扩增缓冲液，其中含 1.5mmol/L $MgCl_2$［PerKin-Elmer；使用 0.01%（*m*/*V*）凝胶］

Ampli Tag Gold DNA 聚合酶（Perkin-Elmer）

10mmol/L 4dNTP 混合液（New England Biolab）

BigDye 终止子循环序列反应试剂盒（Perkin-Elmer），包括预备的反应混合物

线形丙烯酰胺

上样缓冲液：5∶1（*m*/*V*）去离子水化的甲酰胺/25mmol/L EDTA，pH8.0 和 50mg/ml 葡聚糖蓝

PCR 反应管（条管或 96 孔板）

热循环（如 MJ Research）

PCR 纯化旋转柱（Qiagen 或 Wizard PCR Prep；Promega）

ABI 377 DNA 分析系统（Perkin-Elmer）

软件（选择其中之一）：GAP4、PolyPhred、SeqMan（DNAStar）、Sequencher (Gene Codes)

操作平台：Unix 系统支持 GAP4 和 PolyPhred、Macintosh 或 PC 支持 Sequencher 和 SeqMan

1. 设计扩增所需的寡核苷酸引物，选择的引物退火温度需要在 57℃左右，包含 18～22 个碱基。定位引物以确保基因内侧翼序列至少 6bp 长度和每个外显子一起扩增。用 BLAST 搜索（单元 6.3）每个引物以消除非编码的重复元件，比如 Alu 序列或长散在重复元件（LINE)。PCR 扩增和测序要使用同一个引物。

   必须根据 PCR 扩增和外显子序列或其他感兴趣的基因组区域设计引物。尽管有许多电脑程序可以用来辅助设计引物，Wisconsin Package 引物设计程序（Genetics Computer Group，http://www.gcg.com）和 WI primer3 引物设计程序（http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi）均是用户良好型的而且设计出的引物有很好的可信度。

   以上参数已被用于设计扩增一些大小在 174～421 个碱基对的外显子引物。

2. 设置 100μl PCR 反应管的扩增反应：

   50～500ng 基因组 DNA；

   1μmol/L 引物（用 10μmol/L 的工作液）；

   150μmol/L 10mmol/L 4dNTP 混合液；

   1μl AmpliTag Gold DNA 聚合酶；

   10μl 10×PCR 扩增缓冲液，含 1.5mmol/L $MgCl_2$。

3. 按以下扩增循环进行 PCR。

起始步骤：	12min	95℃	（变性）
35 个循环：	30s	94℃	（变性）
	30s	57℃	（退火）
	45s	72℃	（延伸）
终止：	4min	72℃	（延伸）。

4. 用 PCR 纯化柱（如 Qiagen）纯化 PCR 产物（使用或不使用凝胶纯化法）。琼脂糖凝胶电泳（附录 3G）和标准的已知浓缩物对比，估测纯化的扩增子的质量和浓度。或者在测序前测量 OD_{260} 值（附录 3D）以定量 DNA。

5. 用双蒸水将 250μmol/L 的引物储存液稀释成 2.5～3.2μmol/L 的工作液。根据厂家的 BigDye 测序方案设定所感兴趣的扩增子的序列反应循环，并略做如下几处修改：

   2.4μl BigDye 终止子预备的反应混合液；

   1～1.3ng 纯化的扩增子作为模板（>20ng 时，效果更好）；

   加双蒸水定容至 7.4μl。

6. 将反应管置于热循环仪并设置循环如下。

25 个循环：　10s　　96℃　（变性）

　　　　　　5s　　　50℃　（退火）

　　　　　　4min　 60℃　（延伸）

4℃储存样品纯化待用。

7. 为纯化测序的延伸产物，要进行两次乙醇沉淀（附录 3B）或旋式柱纯化（附录 3E）。乙醇沉淀法中，用线形丙烯酰胺作载体使 DNA 颗粒可见。干燥 DNA 颗粒并重悬于 1.2～2μl 上样缓冲液中。
8. 将样品上于 ABI377 测序胶。包括对照在内进行双向测序。
9. 选择软件工具将 ABI 层析图数据转换成数字信息进行分析，检测突变。

由于 GAP4 和 PolyPhred 只能在 Unix 平台运行，为了将在 Macintosh 电脑上的序列信息输入转换到合适的 Unix 主机上，文件转换工具如 Fetch 是必需的。Fetch 可以通过 e-mail 申请（Fetch@dartmouth. edu）免费获得用于非商业用途。而像 Sequencher 和 SwqMan，ABI 层析图文件可以直接在 Macintosh 电脑上转换成类似的格式。因此，SeqMan 和 Sequencher 也可以在 PC/Windows 平台下运行。

备选方案　使用 ABI 3700 DNA 分析仪进行 96 孔板/384 孔板的大量测序

测序是确认常染色体显性遗传病和其他遗传病最敏感的一种方法。通常直接测序包含多个外显子的主要候选基因，通过这一方法对大量人群的 DNA 进行扫描。

材料（标√的项目参见附录 1）

10×*Taq* 缓冲液，没有 $MgCl_2$（Roche）

√25mmol/L $MgCl_2$

√1.25mmol/L 4dNTP 混合物

8pmol/μl 寡核苷酸扩增引物

Taq DNA 聚合酶

Pfu 聚合酶（Stratagene）

Tth XL 3.3×缓冲液（Applied biosystems，Roche）

25mmol/L 乙酸镁溶液

Tth XL DNA 聚合酶（Roche）

基因组 DNA

DNA 分子质量标记物

1U/μl 碱性磷酸酶（USB）

10U/μl 外切核酸酶 Ⅰ（USB）

稀释缓冲液（Exo/ShrAP）：50mmol/L Tris・Cl，pH 8.0

5×BigDye 稀释液（Milli-Q 系列超纯水，过滤消毒；Applied Biosystems）：在 Milli-Q 系列超纯水加入 400mmol/L Tris・Cl 和 10mmol/L $MgCl_2$，pH 9

BigDye 终止子序列分析盒（Applied Biosystems）

96 孔或 384 孔 PCR 平台

热控制/热循环

PERFORMA DTR 96 孔平板（Edge BioSystems）
ABI 3700 DNA 自动化毛细管序列分析仪

1. 在冰上建立一个 25μl PCR 反应体系。用其中的一个反应体系。全部使用高保真性的 DNA 聚合酶混合物。
   PCR 反应体系 A：
   2.5μl 10×*Taq* 缓冲液，没有 $MgCl_2$；
   1.5μl 25mmol/L $MgCl_2$；
   4μl 1.25mmol/L 4dNTP（每个 dNTP 200μmol/L）；
   2.5μl 8pmol/μl 引物（最终 0.8μl）；
   0.5～0.7U *Taq* DNA 聚合酶；
   0.05～0.07U *Pfu* 聚合酶；
   加 ddH_2O 至 25μl。
   PCR 反应体系 B：
   7.5μl *Tth* XL 3.3×缓冲液；
   1μl 25mmol/L 乙酸镁溶液；
   4μl 1.25mmol/L 4dNTP（每个 dNTP 200μmol/L）；
   2.5μl 8pmol/μl 引物（最终 0.8μl）；
   0.25～0.5μl *Tth* XL DNA 聚合酶（Roche）；
   ddH_2O 至 25μl。
   最好的结果通常是完成 200～800bp 片段的扩增。
   根据外显子和内含子交界处的 50～100 碱基的位置确定引物。寡核苷酸引物的大小通常是 18～25 个碱基。它有利于在变性时引物对温度<2℃。预计退火温度是在 T_m 值以下 5℃，但是也要根据实验进行调整。
2. 移取 23μl 的反应物到 96 孔或者 384 孔 PCR 平台并包括 50～100ng 的 2μl/孔基因组 DNA（总体积 24μl/孔）。保持所有的试剂和样本都在冰上。
3. 简单离心。从冰上移取平台到热循环，预热到变性温度。用下列扩增循环执行 PCR。

初步：	2.5min	95℃	（初步变性）
35 个循环	20s	95℃	（变性）
	30s	退火温度	（引物特异性结合）
	1min	72℃	（延伸）
1 个循环	5min	72℃	（最终延伸）

   停止并保存于 4℃。
4. 取 PCR 产物的小样本通过琼脂糖凝胶电泳检测其质量和浓度。用恰当的 DNA 分子质量标记验证产物大小并估计浓度。假设每次序列反应每 100bp 需要 10～15ng 的 PCR 产物，从平台转移 2～5μl 的 PCR 产物到新的 96 孔或者 384 孔 PCR 平台提纯和循环序列。
5. 为了在 PCR 的混合物中得到寡核苷酸和 dNTP 准备下列的酶。准备过量反应所需要的标准混合物（准备 240μl 在 96 孔反应中）。移取 2μl 酶到每个 PCR 的反应体系中：

0.1μl 1U/μl 碱性磷酸酶；
0.1μl 10U/μl 外切核酸酶 I；
1.8μl 稀释缓冲液。

6. 简单的脉冲离心使残留液沿着管壁流下。替代 PCR 管在热控制/热循环使用下列参数。

1 个循环	15min	37℃	（酶孵化）
	15min	80℃	（酶热失活）
		4℃	（保存）

暂时保存样本于 4℃或者冻存于－20℃直到序列分析。

7. 为了纯化 PCR 产物，直接独立加循环序列试剂或者作为一个准备的混合物（在这点上 PCR 平台的无变化是必需的）。集合试剂和扩大反应的数量。每个体系反应：
4～7μl 酶纯化的 PCR 产物；
1～2μl 测序引物（4～8pmol，推荐 4pmol）；
2μl BigDye 终止子；
6μl 1×BigDye 稀释液；
加 ddH_2O 至 21μl 总体积。

避免 BigDye 试剂的过度曝光，因为这样会导致荧光信号的减弱。

选择成对的测序引物；每当 PCR 引物不能得到预期结果的时候就需要设计引物。当 PCR 产物非常长或者质量很差（如包括额外的条带）的时候成对的引物就体现出明显的优点。

8. 轻度离心使物质沉淀，置于热循环仪中，并按照以下参数运行热循环仪。

25 个循环：	10s	96℃	（快速切换温度）
	5s	50℃	（快速切换温度）
	4min	60℃	（快速切换温度）

快速切换温度至 4℃，待纯化。

9. 纯化前，轻度离心平板，使物质沉降。根据生产商的使用说明，使用 PERFORMA DTR 96 孔平板纯化循环测序产物。
10. 在 80℃下干燥 1h，并存储在－20℃下，分析前应避光（可存放 3 周）。在放入 ABI 3700 DNA 毛细管测序仪前，应迅速用 10μl 水重新悬浮。
11. 获取 ABI 层析图数据，并进行分析（基本方案，第 9 步）。

参考文献：Nickerson *et al*.，1997

编者：Sandra L. Dabora，Michael Arad，Scott Barr，and Jae Bum Kim

单元 7.5　用循环测序法检测突变

基本方案

在变性聚丙烯酰胺凝胶上分离，并用放射自显影可视化后，通过 DNA 测序步骤（所谓的循环测序）筛选候选基因用于突变。常见问题及其可能原因和补救措施列于

表 7.5.1。

材料（标√的条目参见附录 1）

血液或者其他来自待测个体的 DNA 材料

5mol/L 乙酸钠，pH4.8

异丙醇（纯）

√TE 缓冲液，pH7.4

分子质量标记物：如 X-174 质粒经 *Hae* Ⅲ 消化（Hoefer pharmacia Biotech 或 Life Technologies）

12.5pmol 寡聚核苷酸测序引物

√10×T4 多聚核苷酸激酶反应缓冲液

10μCi/μl [γ-^{32}P] ATP（3000Ci/mmol），10μCi/μl [γ-^{33}P] ATP（3000Ci/mmol）或者 10μCi/μl [γ-^{35}P] ATP（3000Ci/mmol）

5U/μl T4 多聚核苷酸激酶

双脱氧核苷酸：100μmol/L ddGTP（或者 7-deaza-dGTP 对于富含 GC 的模板）600μmol/L ddATP、1000μmol/L ddTTP 和 600μmol/L ddCTP

2 U/μl *Taq* DNA 聚合酶

√10×循环测序反应缓冲液

矿物油（如果有必要的话，依赖于循环仪）

√终止液

热循环仪和管子

表 7.5.1 循环测序法故障指导

问题	可能原因	解决办法
在 4 条泳道的相同位置都可以看到条带，尤其是靠近引物的位置	模板不纯净	用对照 DNA 看问题是否依然存在；如果存在重新提纯 DNA
	不正确的引物退火温度	降低引物退火温度，通过使用更长（更稳定）的引物；增加退火和延伸时间
	不纯净或过期试剂，ddNTP 总量过高，或 dNTP 总量过低	准备新试剂并重新调整 dNTP/ddNTP 的比率
在凝胶上低于某一位点条带很深，但超过这一位点的条带则很浅	模板二级结构迫切延伸	使用更高的反应温度
一条深带跨越凝胶的 4 条泳道；低于和高于它的条带也同样深	反应产物的二级结构导致凝胶中产物的异常电泳位置	使用更高的凝胶温度或甲酰胺凝胶；在反应中使用碱基类似物或 TdT；检查 PCR 产物纯化程序
凝胶底部条带的亮度太低	反应产物比例在接近凝胶底部太低	增加测序混合物中 ddNTP/dNTP 的比率
反应的一条泳道失败或太暗或 smeary 带	可能在一个反应槽孔中的循环控制装置出故障 Pipeting 错误	检查循环控制装置性能 检查程序步骤
所有泳道出现 smeary 或	模板包含其他 DNA 分子	设置阴性对照；重复进行 DNA 制备过程

续表

问题	可能原因	解决办法
表现出高背景	非特异性引物，可能包含DNA分子	回收纯化胶中DNA或者使用不同的寡核苷酸（如设计内引物）
	引物不纯	检测引物纯度
	PCR仪问题	检测PCR仪功能
	试剂问题	检查程序步骤；使用新的试剂
	引物/模板比例太高或太低	优化引物/模板比例
	不适当的引物退火温度	为反应体系重新计算 T_m 值
测序结果很暗	模板或引物的量不够	模板和引物量加倍
	模板和引物错配	重新检查模板和引物结合的特异性
	PCR仪出现故障，反应条件不适当	检查PCR仪的运行情况，增加循环的时间和次数，优化反应中的温度设置
	寡核苷酸没有充分标记	通过检测标记物和TCA沉淀物质（含量应该在40%～50%）之间的反应来检查标记反应中可能出现的问题（如灭活的激酶），见附录3E
	模板中含有较多的盐或其他干扰反应的杂质	乙醇沉淀后再重悬模板
	Taq DNA酶失活	更换新的酶
	反应缓冲液不纯	准备新的缓冲液
油封反应增加上样难度	过多的油封物质存在	去除这些物质或者使用hot-top装置，在上样前点离反应体系

1. 使用标准方法分离纯化人类基因组DNA（如附录3A，单元9.8和单元10.4），最后一步是在水或TE缓冲液中重悬DNA。

   每循环测序反应只需要10～20fmol DNA模板（附录3D——DNA定量方法）。使用如下方法可以很容易地计算出DNA双链（组成10fmol DNA模板）的数量：ngDNA模板＝10fmol×N×6.6×10^{-3}，其中的N是测序模板碱基对的数量。
2. 准备一个待测序的DNA模板，PCR扩增感兴趣的DNA基因组片段，如单元7.1中描述。
3. 在50μl的PCR反应中加入50μl的5mol/L乙酸钠，pH4.8和100μl纯异丙醇。室温孵化10min。室温下最大速度（16 000g）微量离心10min。弃上清，自然干燥。
4. 颗粒于50μl水或TE缓冲液中重悬（pH7.4）。通过分析每5μl琼脂糖上样量并与已知结果的标签（如1μg ΦX-174质粒消化*Hae*Ⅲ）进行比对计算出重悬DNA的数量。
5. 准备25μl引物标记反应，混合体系包括：

   12.5pmol寡核苷酸序列引物；

2.5μl 10×T4 多聚核苷酸激酶反应缓冲液；

1.0μl 5U/μl T4 多聚核苷酸激酶（共 5U）；

3.0μl 10μl Ci/μl [γ-^{32}P] ATP 或 [γ-^{33}P] ATP（共 30μCi）或 2.0μl 10μl Ci/μl [γ-^{35}S] ATP（共 20μCi）；

加水至 25μl 。

37℃孵化 30min（12.5pmol 标记引物需 100 个连续的反应）。−20℃储存已标记引物一周以上。

测序引物立即在 5s 内被导入序列中并荧光显示出突变位点。可以使用 PCR 引物或嵌套引物。因为只有一个引物是有用的，扩增是线性的，不是指数的。

6. 对于每一个 DNA 模板，准备 4 个热力管，分别加入 3μl 下列试剂：100μmol/L ddGTP、600μmol/L ddATP、1000μmol/L ddTTP 或 600μmol/L ddCTP。冰浴储存。
7. 准备测序用的体系储存在一个新的管子中：

   10～20fmol 序列模板（第 5 步得到的 DNA 溶液）；

   1μl 5 端标记的测序引物（从第 6 步中得到）；

   4μl 10×循环测序反应缓冲液；

   1μl 2U/μl *Taq* DNA 聚合酶（共 2U）；

   加水至 30μl 。

   分别向 4 个测序管中加入 7μl 的体系等份试样（第 6 步所准备的）。对于富含 GC 的模板中，dGTP 能够被 7-deaza-dGTP 所取代，以最小化序列表达。
8. 加矿物油（如有必要）。关闭管帽，启动热循环。循环条件根据不同的模板、测序引物、热循环设计有所不同。以标准 PCR 条件开始，通过改变反应温度、循环时间和循环次数来优化测序反应（CPMB 单元 15.1）。

   标准的 PCR 程序基本上包括 30 个循环，其温度分别为 94℃、55℃、72℃。每个温度持续的时间不相同，如在 Perkin-Elmer Cetus 4800 热循环中分别为 1min、1min、2min；而在 Perkin-Elmer Cetus 9600 或 MJ Research PTC-200 中则分别为 15s、15s、30s。
9. 热循环结束后，在每个反应管中加 5μl 溶液停止循环，并在 95℃热变性 5min，然后在<4℃的环境中迅速冷却。
10. 分析循环后的产物用 6%或 8%的聚丙烯酰胺凝胶电泳装载 5μl 变性产物，然后按照要求尽可能快地跑胶。当同时扫描不同个体的 DNA 样本时，把 G 反应同时点在胶上（紧接 A. T. C 反应之后），使确定突变更为容易。
11. 干胶，在自显影仪上过夜。

参考文献：Murray，1989.

编者：Ludwig Thierfelder

单元 7.6　人类突变数据库

突变数据库的类型

总突变数据库

总突变数据库包括整个人类基因组的变异集合信息。一些数据库仅仅收集了突变的信息，其他的仅仅搜集了单核苷酸多态性（SNP；详见下文的数据提交的标准，关于突变和多态性的差异）。这些数据库通过对所有的基因提供一系列的用户界面作为分析现存的数据信息。所有的总数据库对于医学遗传学而言，它们自己没有一个有足够的信息，因为它们的管理不是通过专家而是通过每个能用多种途径收集信息的生物信息学家们。由于每个基因的描述要包括变异的信息，所以只有公开发表的突变信息才能被包括在这些数据库里面。没有公开发表的数据仍然没有在这些数据库上。这些数据库之间的区别特征见表 7.6.1。以总突变数据库为例，如下是突变数据库的访问数据。

表 7.6.1　Locus-Specific Databases 和 Central Databases 的当前特征

特征	Locus-Specific Databases	Central Databases
突变收集	发表/不发表	发表
多态	经常收集	经常不收集
患者表型数据	经常收集	经常不收集
测定数据	经常收集	经常不收集
突变的复杂发生	经常收集	从不收集
种族/地理分布	经常收集	从不收集

Locus-Specific Databases（LSDB）

LSDB 主要包括单个基因的变异，经常由研究特定的基因或表型的科学专家组成的共同研究协会管理。一些管理员在一个独立的网络上专门负责大量的特殊的疾病及与之相关的一系列基因组。由于管理人员是专家，所以 LSDB 经常比其他总突变数据库囊括更多的单个突变信息（见表 7.6.1），而一些突变数据库由于包括广泛的信息以致成为了知识库，如苯丙氨酸羟化酶数据库。LSDB 经常比其他总突变数据库囊括更多的单个突变信息是因为其包括了没有公开发表的由专家提供的突变数据库。没有公开发表的突变经常等同于发表的突变，这是一个巨大的变异信息。这个数据库的典型特征在表 7.6.1 上可见。

现在在因特网上有超过 270 个 LSDB，并有更多的趋势。由于这些在信息学上不同的专家管理员有或没有能力花费时间和金钱，LSDB 在内容和显示上有很大的不同（Claustres *et al.*，2002）。一些 LSDB 仅仅包括突变的搜集及其参考资料，而另外一些则包括很多有价值的知识。LSDB 的详细的综述在 Claustres 等文章上可见（2002）。主

要的 LSDB 的链接在 HGVS 上可见。这篇综述同时提供了一些详细数据库的内容介绍。

数据提交到突变数据库

提交的方法

突变提交到数据库里有多种方法。其中有一种是发表刊物的搜索——大多数的总突变数据库的更新是通过在计算机上搜索周或月更新。突变也可直接提交到数据库中。

研究者通常直接通过他们自己的管理员提交或者通过填写一张数据库中提供的电子表格的方式提交突变数据。这个过程通常在公开发表之前完成，或者没有预期发表。SNP 数据库上也存在直接提交的方式。为了尽可能大量的收集突变信息，这个单位的著者力劝读者将任何没有公开发表的突变信息提交到合适的数据库。HUGO MDI 已经开发了一种以提交突变信息向导的方式帮助管理数据的方法（图 7.6.1）。在 Claustres 等的综述中显示了有 16%的 LSDB 在他们的数据库里用这种形式搜集突变信息。

样本等位基因变异进入方式

在以下区域进入等位基因变异/突变和多态现象（SNP 的），数据库管理员确认后可以进入并向数据库中添加信息。每一次投稿的数据将被记录，你将收到投稿被接纳并批准的电子邮件确认。

请在评论区添加尽量多的描述信息；值得注意的是，尽量以 RNA 和蛋白质产物的方式给出完整的描述变异的结果。

有任何问题可以给我们发电子邮件。

按照下面格式：
名：
姓：
电子邮件地址：
实验室：
一般信息
基因/基因座名称：
基因标记：
种类：　变异造成的疾病□　多态不造成疾病□　尚不清楚□
变异/多态名称（按照 nomenclature 指导）
Aliases/Published 名称：
变异类型　氨基酸替换□　终止密码子□　RNA 拼接□　插入□
　复制□　没有变化□　未知□　其他____
DNA
位置（外显子/内含子）：
核苷酸（或起始核苷酸）：
#碱基插入或删除：

图 7.6.1　为变异数据库提出的 HUGO 变异数据库创始等位基因变异登录格式。hppt://www.hgvs.org/entry.html。

最初的来源：

新的来源：

蛋白质

变异名称（按照 nomenclature 指导）

旧氨基酸：

新氨基酸：

残基＃：

变异/多态质量保证目录

变异/多态在重复 PCR 样本中发现　是□　否□　不确定□

具有特征的变异分离　是□　否□　不确定□

父母、祖父母、兄弟姐妹或其他家庭成员携带者情况/结果检测　是□　否□　不确定□

同一等位基因没有其他变异（in cis）　是□　否□　不确定□

变异影响保守残基　是□　否□　不确定□

剪切变异信息内容　是□　否□　不确定□

表达分析证实表型作用　是□　否□　不确定□

正常个体测试的数量/频率　是□　否□　不确定□

其他数据库

HGMD 中的变异　是□　否□

LSDB 中的变异　是□　否□

检测

对变异的 cDNA 分析　是□　否□

对变异的基因组 DNA 分析　是□　否□

检测方法：

检测条件：（引物序列、PCR 和电泳条件……）

分析的 DNA 长度：

发展的诊断方法：（ASO 等）

为其他做测试的能力　是□　否□

注释：

单一类型联合：

总体联合：

地理联合：

其他：

参考文献：

图 7.6.1（续）

数据提交的标准

在材料被数据库记录之前，必须确保这些数据是最高质量的。命名法必须有一致的标准及完成质量控制检查。

命名法

关于命名法的问题已经在两个水平上被讨论：①名词“突变”的含义；②如何定义一个“突变”。“突变”，在生物学意义上是指 DNA 序列的改变；然而在临床医学上，“突变”指一个能引起疾病的基本改变，而多态性是指无害改变，这个问题已经在 Cotton 和 Scriver（1998）写的文章中被讨论，而且 Victor McKusick 的结论是所有基本改变均等位基因的变异。

关于划定标准，HUGO MDI 命名工作组已经确定并且公布了基于 DNA 改变的系统命名的建议。目前这些建议已经被广泛接受。例如，系统命名 c. 2674C→A 表示在 cDNA 第 2764 个碱基上的 C 突变成 A。相应的细微的变化的命名 T265Y 用来表示编码氨基酸的单链，且此链 265 号上的苏氨酸突变成酪氨酸。如果同样的突变被描述成在发生在基因组 DNA 的突变则应该是 g. 2674C→A。反过来如果是 2674 上的 C 碱基发生缺失，则描述为 g. 2674delC。更多的细节和例子可以到 HGVS 网站上的命名建议网页上查看。

质量控制

基因的碱基改变应该在数据库中如实地报道。因此，在提交一个突变之前应该先检查几点，以保证数据库中数据的高质量。尽管作者认为这一点没必要，但是如果所公布的突变数据直接进入突变数据库则要求其质量要高。在质量控制中要注意的最重要的特点可见表 7. 6. 2。

表 7. 6. 2　提交给数据库的数据的质量控制

特点	评价
PCR 错误	是否从患者的 DNA 中放大而来的第二个 PCR 样本也发现了这个改变
不完全扫描	即使发现了一个突变，扫描也不应该停止。因为第二个突变可能是导致疾病的所在。假如应用一种只能检测到≤80％的突变的方法，一些信息则可能漏掉
表型	是否当表型出现时这个改变也总是出现
在 100 个正常人中出现？	理想情况下，要证明一个突变能导致疾病，这个突变将不会出现在 100 个正常人的染色体中
保守残基	这个碱基的改变是否出现在保守的残基序列中？如果是，则其很可能是导致疾病的所在
多态？	这个碱基改变被报道的频率在普通人群中是否＞1％
报道错误	印刷错误
	凝胶的误读
	碱基位置的不正确分配
	氨基酸改变的不正确推论

从突变数据库中获得数据

突变数据可通过很多途径获得：可通过一般突变数据库如 OMIM、HGMD 或其他

数据库，或通过 270 LSDB 等途径获得。在这些数据库中直接查找是一个相对来说简单而又直接的方法。读者可用某个感兴趣的基因来熟悉 OMIM、HGND 与 LSDB 数据库，还可以比较一下这几个数据库中所包含的信息有何不同。在以下的段落中举几个例子。

总突变数据库

在线孟德尔人类遗传数据库（OMIM）

OMIM 包含遗传疾病和所有已知的基因；但是只选择性地包含已发表的突变数据，这些数据包括在某个基因座首次被描述的突变，在某个基因座中最常见（12 次左右）的突变，有历史时代兴趣的突变，可以演示一个不寻常的导致基因发生突变的过程或是不寻常的病理过程的突变，或是其他任何感兴趣的突变。这些信息以文本的方式显示——尤其是附有参考文献的临床信息，链接到 MEDLINE 的文献，还有相关序列的信息。截至 2003 年 12 月 3 日，OMIM 一共有 14 053 个突变数据。

要在 OMIM 中获得突变数据，你可以用疾病名称、基因名称或 OMIM 序列索取号进行检索。检索的结果是一个基因或多个基因，附带有序列索取号。点击每一个基因，就会出现包含这个基因的相关内容的表格。注意有一个名为等位变异体/查看等位变异体的部分，这是可以找到所有 OMIM 能获得的突变信息的地方。

人类基因突变数据库（HGMD）

HGMD 自 1996 年以来可以在线公开获取。这个数据库是对所有已公布的核基因的种系突变的收集或索引，附带有相应的参考文献和每个基因的突变的总结。基因图谱和参考序列也包含在该数据库中。但是，由于商业原因，数据从出版的时间到出现在 HGMD 的公开版本有一段很长的滞后时间。截至 2002 年 9 月 2 日，HGMD 包含有 1245 个基因的 30 641 个突变，并提供了 1100 个 cDNA 参考序列。

这个数据库可以用疾病名称、基因名称、基因特征、GDB 或 OMIM 序列索取号来进行检索。HGMD 将信息列成表格的形式并且将其按突变类型（如微缺失或微插入等）或表型（链接到与此表型匹配的 OMIM 数据）分类。选择其中一种突变类型，如核苷酸替换，会出现一张表格，罗列所有相关位点上的核苷酸替换、替换类型、表型、与此替换有关的参考文献及与 PubMed 的链接。突变的分布可以通过查看该数据库提供的突变图谱来获得；该图谱是以图解的形式展示各个编码区的突变。该数据库也提供不同类型的突变发生的频率，也提供某个基因到 LSDB 的链接。

人类基因组变异数据库（HGVbase）

这个数据库的前身是 HGBASE。HGVbase 试图总结人类基因组中所有已知的序列变异（包括突变与 SNP、indel、简单串联重复及其他序列改变等），推进对基因型如何导致常见疾病的发生、药物反应及其他复杂表型的研究。所有的序列变异都详细地描述了其如何在位置上和功能上与其邻近的基因相关。目前大部分的数据都是 SNP 的形式。数据是通过收集（在允许的情况下），或者从所有大型公开的基因组数据库中提交，或者从之前 10 年左右发表的论文中摘录的，研究组的投稿同样受欢迎。每一条记录的广

泛注解和检查指南是为了保证能找到潜在的错误和不足之处。

dbSNP

最常见的遗传变异是单核苷酸多态性（SNP），大概每100～300个碱基发生一次。SNP这个词被dbSNP数据库不精确地用来表示“微小遗传变异”：因此dbSNP包括导致疾病的临床突变和中性的多态性，尽管它很可能包括多态。最近科学家们对于SNP的发现有很浓的兴趣，而且对于SNP的检测也被认为可以推进大规模的相关遗传学研究。1998年9月建立的美国国立生物信息学中心（NCBI）可认为是SNP、微卫星重复与小插入/缺失多态性的中心库，这个数据库现在有超过400万的人类SNP。尽管不是GenBank的一部分，但是dbSNP所报道的序列被认为包含在一个或更多个GenBank记录中。所有实验室均被邀请投稿；其中与美国NHGRI这一巨大项目有联系的实验室为此做出了主要的贡献。

国家和种族突变数据库

数据库收集了一些特殊国家和特异民族的基因突变以确保完整的突变收集。这对于患者的治疗和诊断是很有帮助的。临床医师、遗传学家、健康顾问等可以把它作为一种诊断工具。阿拉伯遗传疾病数据库就是一个很好的例子，它收录了超过一千个发生在阿拉伯人群中的单一的注释条目。尽管没有很多这样的在线数据库，但已经有几个在进展中了，如芬兰、韩国及中国的疾病数据库。HGVS鼓励创建这样的数据库。

基因座专一数据库（LSDB）

一个基因座专一数据库可能包含大量的信息也可能包含很少，这取决于基因的情况。因为没有统一的标准、介绍、用户界面，基因座专一数据库的内容像被超过270个可用的基因转座专一数据库覆盖着的遗传位点一样多。LSDB不同于简单的flat-file数据库，它由一个突变目录和附加的发表参考资料组成，这些参考资料与附带诸如患者的种族以及地理起源、检测方法、限制性内切核酸酶位点、临床信息等信息的知识库相互作用。苯丙氨酸羟化酶知识库是一个模型LSDB。这个数据库由超过80个苯丙氨酸羟化酶领域的专家团运作。突变数据库根据已发表的文献和来自PAH突变分析专家团的个人交流来校对。数据库力争为用户提供这一范围的最新突变信息。我们可以通过突变名称、多态单体型、种族、地理位置、基因区域、可读框数目、突变类型、替换、表型及作者名字来进行搜索。数据可以通过电子格式传送到数据库。关于苯丙酮尿症的信息可以直接提供给患者和他们的家属，还可以链接到其他的信息资源。人类血红蛋白变异摘要以及血液抗原数据库是两个非常出色但完全不同的LSDB。本章作者希望其他的LSDB能够参照以上几个例子。

在HGVS网站上有一个完整的LSDB和其他突变数据库的清单。HGVS是所有数据库中已经被发表了的一个数据库。数据库中的信息是通过已确认的HUGO基因的特征按照字母表的顺序列出。而且还提供与OMIM中相关信息的链接。

创建一个基因转座专一数据库的步骤

很多 curators 在需要时会为自己感兴趣的基因创建一个突变数据库，这来自于 HUGO MDI（现在为 HGVS）的激励。为了确保两个数据库间通畅的交流，需要制定很多统一的标准，HUGO MDI 工作组已经为命名方法、数据库的内容及质量控制提供了很多建议。这些建议可以在 HGVS 网站上浏览到。创建一个 LSDB 的步骤如下。

1. 与 HGVS 办公室的 Ourania Horaitis 联系（horaitis@medstv. unimelb. edu. au）以确定是否有其他人也在为这个基因创造一个新的数据库。
2. 组建一个对此感兴趣的研究者和临床医师的团队以对其进行拓展。如果需要的话通过组成一个致力于发现一个新的 curator 团队来保证数据库的寿命。或许几年后最初的调查者不会再对这个基因关注了。最近，PAH 数据库指派 subcurators 设计数据库的特殊领域，进一步拓展数据库。
3. 收集所有对这个基因感兴趣的调查者所描述的突变，包括多态以及根据 HGVS 网站提供的命名法对其进行的命名。有的人可能希望将这种数据以一种综述的形式在诸如人类突变或者其他合适的期刊上发表。这对于收集相关的信息来说是一个好的动机，因此一个实用的出版物将会产生。
4. 收集核心数据（表 7.6.3）。为了使数据库更加有意义并更加实用，必须收集核心数据的所有成分。当然其他数据尤其是关于疾病和感兴趣的基因的相关信息也可以被收录进来。经过 HUGO 证实的基因特征、染色体区域、基因信息、定位的内含子或外显子、表型（如果有的话）、RNA 效应、蛋白质效应、监测方法、对临床医师和患者有用的疾病临床数据、地理起源、种族起源、表达研究、对数据库有贡献的人员名单及各相关联盟和组织的名单。由 Claustres 等撰写的评论文章也为构建一个理想的 LSDB 提供的一系列的建议。

表 7.6.3　Screver 等提供的核心信息（主要内容）

条目编号	包括的信息
1	每个等位基因的唯一识别信息必须在数据库中公布
2	数据的资源或记录
3	等位基因的参考资料和序列号——DDBJ/EMBL/GenBank
4	经过 Antonarakis 等（1998），den Dunnen 和 Antonarakis（2000）指导等位基因命名
5	尽可能全地描述它的改变
6	用来显示数据库生物图谱和细节图谱的文件
7	为了相互兼容，链接到其他数据库（如 OMIM）中的最小设置必须被创建
8	数据库最近更新时的数据

5. 选用合适的软件。HGVS 希望将来能够开发一种理想的软件用来为 LSDB 确定一个统一的标准。尽管如此，到目前为止，HGVS 成员最近已经申请了三个 LSDB 特异性软件，这些软件都被单独地在 LSDBS 软件的创建者和使用者下描述，可以通过直接与软件的创建者联系以获得任何一个软件的使用权。通过观察在软件操控下的数

据库来确定哪个更适合于自己的研究工作。相关的信息可以在各自的网站上获取。使用 HTML 来创建一个简单的 flat-file 数据库也是可以的。Claustres 等指出有 72% 的 LSDB 使用这种格式，尽管使用这种格式并不理想。

6. 数据库一但被创建，就会在 HGVS 在线目录和 HGVS 时事评论中注册。这样就可以对整个团体开放。参考 HGVS 网站上这一步骤操作的相关信息。

用来创建和管理 LSDB 的软件

MuStaR（突变存储及检索）。1999 年 Alastair 开发了这个软件，这款软件首先被用来处理 *PAX6* 基因，后来又用于 *PAX2* 基因。近来这款软件在其他地方也被广泛地应用，如在建立 SHOX 突变数据库方面的应用。这款管理软件是基于 Microsoft Access 的。数据库的相关网站在 Unix 和 Windows 运行环境均可被创建。而这款软件本身在装有 Windows 系统的个人电脑上是被限制的。这款软件对学术界免费开放。

Universal mutation database（UMD）。1994 年 Christophe Beroud 开发了这款软件并且被用来处理很多基因，如 *p53*、*WT1*、*BRCA1*、*BRCA2* 等。这款软件是基于四维技术并且使用了 4D 语言。UMD 目前可以免费使用。尽管这是一个突变和患者导向性的软件，但它被一个服务器所拥有，因此在 LSDB 当地的系统内无法使用。

MUTbase。Mauno Vihinen 和他的合作者于 1999 年开发了这款软件。目前 MUTbase 系统被用来处理包括 *ADA*、*AIRE*、*BLM*、*BTK*、*C2*、*CYBA*、*CYBB*、*IKBKG*、*IL12RB1*、*ITGB2*、*JAK3*、*NCF1*、*NCF2*、*PNP*、*RAG1*、*RAG2*、*SH2DIA* 及 *ZAP70* 在内的超过 30 个免疫缺陷基因。MUTbase 是一个以患者为基础的软件，它收录了每个患者的临床信息。另外，这款软件只能在它的服务器上运行，在个人的本地系统上是无法运行的。

参考文献：Claustres *et al*.，2002；Cotton and Scriver，1998

编者：Ourania Horaitis and Richard G. H. Cotton

第8章 临床细胞遗传学

细胞遗传学分析为大规模筛查发育异常综合征相关的遗传重排提供了快速筛查手段。植物血凝素促有丝分裂效应的发现以及简单快速培养淋巴细胞方法的发展使染色体分析成为医院临床实验室开展临床检验的组成部分之一。荧光原位杂交（FISH）已成为常规临床检测项目被用于检测许多微缺失综合征及重排染色体。

本书在第4章中已经给出了人类染色体的制备、染色及原位杂交的操作方法，在本章中将列举这些技术的临床应用。

外周血淋巴细胞培养和染色体染色技术中提到的染色体显带部分请参见单元4.1及单元4.3。这些技术应用于绒毛组织的产前细胞遗传学分析见单元8.1，应用于羊水细胞的产前细胞遗传学分析见单元8.2。绒毛膜样本可以在妊娠前三个月做出遗传学诊断，但由于采集绒毛导致并发症率稍高，所以该方法受到一定的限制。绒毛和羊水样本的分析均会受到假性嵌合结果的误导。在单元8.3中给出了成纤维细胞培养和细胞遗传学分析的操作方法。这有助于研究妊娠活婴的脱落产物，以及研究发现有可能存在染色体嵌合现象时对第二种组织的分析。

为研究以染色体断裂频率增加为特征的异常提供了两套特别操作方案。Bloom综合征是一种常染色体隐性遗传病，其特征为身材矮小、有光敏性皮疹、患恶性肿瘤的概率增高。它的发生和单元8.4中所描述的高频率的姐妹染色单体互换有关。范可尼贫血是一种常染色体隐性遗传病，其特征为再生障碍性贫血和先天畸形。对于该疾病患者和携带者最敏感的检测方法是当细胞在含有二氧桥丁烷的环境下生长时检测染色体断裂比例的增高，该方法参见单元8.7。

分子水平的分析技术正日益与常规细胞遗传学分析技术相结合。荧光原位杂交为在显微镜水平分析染色体结构和在DNA水平检测染色体改变之间架起了一座桥梁。常规的FISH操作方法已于单元4.4中给出，那么在单元8.5中我们列出了在间期细胞核中检测染色体非整倍体的FISH方法（亦给出了染色体特异性重复序列探针的说明）。当无法获得分裂细胞用于细胞遗传学分析时该方法将非常有用，如已存档的病检材料。尽管该方法不能取代全部染色体分析方法对绒毛及羊水细胞更加全面的分析，但它亦适用于常见染色体非整倍体的快速产前诊断（单元8.6）。

40年前人们认为人类二倍体细胞中染色体的数目为48条。今天我们已经在攻克人类基因组全部序列图的探索道路上大步前进。细胞遗传学分析技术始终走在遗传学理论知识应用于临床实践的前沿。尽管可以预见细胞遗传学技术和分子遗传学技术将日益紧密的融合，但通过研究染色体来观察基因组将在很长时间内仍保持其重要作用。

编者：Bruce Korf

单元 8.1　绒毛标本分裂中期染色体涂片制备

基本方案　培养法制备绒毛分裂中期染色体涂片

绒毛的间质中心包括一系列细胞成分——成纤维细胞、内皮细胞和巨噬细胞，以及大量的细胞间质。绒毛中心的成纤维细胞能够在体外快速增殖，是细胞遗传学分析的合适材料。

注意： 如无特殊要求，所有的培养都必须在 37℃、含 5% CO_2 且湿润的培养箱中进行。

材料（标√的条目参见附录 1）

15～20mg 绒毛样本
√HBSS
√胰酶/EDTA/HBSS 溶液
√胶原蛋白酶溶液
完全培养基：Chang 原位培养基（Irvine Scientific）或 Amniomax（Life Technologies），37℃
10μg/ml 秋水仙胺（如 Life Technologies）
1%（*m*/*V*）枸橼酸钠，37℃
固定剂：3∶1（*V*/*V*）甲醛/冰乙酸，4℃（新鲜配制）
无菌 Watchmaker 精细镊（瓦氏精细镊）
4.5ml 冷试管（Nunc）
摇床试管混合器（血液混合器）
Sorvall GLC-2B 离心设备，HL-4 转子和 6 个 15ml 离心管（或同等设备）
35mm 塑料培养皿
倒置显微镜或解剖显微镜
热气增湿器
空气泵

1. 在倒置相差显微镜下用灭菌瓦氏精细镊从母源蜕膜中仔细分离出绒毛。将绒毛转入 HBSS 中清洗，更换 HBSS 直至绒毛洗净。将绒毛分为两部分，一部分用于培养（第 2 步），其余用于直接制备（备选方案，第 1 步）。
2. 将切细和洗净的绒毛 4～10mg 转入含有 4ml 胰酶/EDTA/HBSS 溶液的 4.5ml 灭菌冷试管中。于摇床试管混合器上 37℃孵育 60min。室温下 800*g* 离心 5min。
3. 轻轻吸去胰酶溶液。加入 1.5～2ml 的胶原蛋白酶溶液，于摇床试管混合器上 37℃孵育 30min。
4. 室温下 800*g* 离心 5min。轻轻吸去胶原蛋白酶溶液，余约 0.5ml 于试管中。
5. 用巴斯德吸管（巴氏吸管）轻轻吹打绒毛及剩余胶原蛋白酶溶液 10 次，将绒毛吹打

成单个细胞悬液。在悬液中加入 3ml 预热的 Chang 原位培养基。

6. 将 0.5ml 单细胞悬液置于火焰灭菌的盖玻片表面，放入 2～6 个标记过的 35mm 塑料细菌培养皿中。如果盖玻片上的细胞悬液过浓（倒置显微镜下观察），用 Chang 原位培养基稀释。培养 24h。
7. 每个皿中加入 2ml Chang 原位培养基，培养至细胞贴于盖玻片上（2～3d）。
8. 细胞贴于盖玻片上之后，吸去培养基，加入 2ml 新鲜 Chang 原位培养基，继续培养。

    最好的培养结果是仅仅从间质中心得到培养。如果有过多的碎片或母源细胞污染（悬浮细胞），则盖玻片必须小心移入另外一个含 2ml Chang 原位培养基的皿中。

    1～2d 后会出现类似于巢状的成纤维细胞克隆，5～7d 的平皿培养后盖玻片就可以准备收获了，这取决于细胞生长和有丝分裂的活性（如克隆的数量和大小及分裂细胞的数量）。

9. 每个皿中加入 10μl 秋水仙胺，孵育 1h。从皿中移去培养基，加入 3ml 预热的 1%枸橼酸钠。孵育 20min。
10. 在皿中小心加入 2ml 4℃新鲜配制的固定剂，室温下放置 2min。
11. 吸去枸橼酸钠/固定剂溶液，再次加入 2ml 4℃新鲜配制固定剂。放置 20min。再重复固定两次，第一次固定 20min，第二次固定 10min。
12. 吸去固定剂，除去多余液体，立即干燥盖玻片。将盖玻片表面暴露于热气中 1～3s。立即将盖玻片表面置于空气泵泵出的柔和气流中。如需要可以观察盖玻片表面以保证均匀干燥及调整气流。

    盖玻片的正确干燥是整个实验成功的关键。

13. 倒置显微镜下观察盖玻片，判断染色体分散的程度。如需要可调整干燥程序以便得到更好的分裂相。
14. 用胰酶-吉姆萨显带法对染色体染色。
15. 对 7～10 个中期分裂相拍照分析，对 2 个中期分裂相拍照并进行核型分析（附录 3K）。

备选方案　直接法制备绒毛分裂中期染色体涂片

中期分裂相涂片可从滋养层细胞（细胞滋养层的郎格汉斯细胞）自发的有丝分裂或经过有限周期（如仅仅数小时）培养的滋养层获得。

附加材料（标√的条目参见附录 1）

切细和洗净的绒毛标本（基本方案）
√完全 RPMI/含 1%庆大霉素的 20%FBS，37℃
√10μmol/L 氟脱氧尿苷（FUdR）
√1mmol/L 胸腺嘧啶核苷
60%（V/V）冰乙酸溶于水（新鲜配制）
√制片的辅助材料
玻片加热器

65℃或90℃恒温箱

1. 将培养法中没有用到的剩余绒毛放入盛有3ml已预热至37℃的完全RPMI/含1%庆大霉素的20%FBS的培养皿中。培养3h以上（绝不能少于3h）。
2. 加入10mmol/L的FUdR（终浓度3.3×10^{-7}mol/L）0.1ml使培养同步化。培养15～17h。
3. 加入1mmol/L的胸腺嘧啶核苷（终浓度3.3×10^{-5}mol/L）0.1ml。培养5h（如果对分裂中期收获率无不利影响，在胸腺嘧啶核苷中培养的时间可以3～8h不等）。
4. 加入秋水仙胺使其终浓度为0.5μg/ml，孵育2h。从培养箱中取出培养皿，用巴氏吸管轻轻吸去培养基。
5. 缓慢加入3ml 37℃ 1%枸橼酸钠，孵育20min。小心加入0.5ml 4℃固定剂终止枸橼酸钠的低渗作用。
6. 吸去枸橼酸钠/固定剂溶液，加入2ml 4℃新鲜配制固定剂。摇晃培养皿冲洗绒毛，吸去固定剂。再加入2ml固定剂置于冰箱中过夜（如需24h内出结果则置于冰箱中20min）。
7. 移去固定剂并于室温下放置1～2min，使残余固定剂蒸发。
8. 加入100～200μl 60%冰乙酸。于倒置相差显微镜下观察细胞从绒毛中释放的情况。轻柔振荡。当细胞的释放非常明显（单个细胞从组织中游离）时即可制片。检查单个漂浮细胞的数量。

用涂布器制片

9a. 将一张标记好的玻片置于已达到45℃的玻片加热装置的表面。滴100μl混合好的细胞悬液于玻片上，用涂布器轻轻将细胞悬液涂布于整个玻片。

10a. 不用涂布器涂布玻片表面，用另一只手缓慢移动玻片，涂布器就可以使细胞悬液沿着玻片长轴方向分散覆盖玻片中心50%～60%的区域。来回重复3～5次，每个来回30～60s（共3～5min），使细胞悬液充分铺开且干燥。

11a. 从玻片加热装置上取出玻片，从玻片边缘吸干残余液体。在倒置显微镜下观察分裂相分散铺片情况。玻片染色前于65℃恒温箱中过夜或90℃恒温箱中10min（第12步）。

用制片机制片

9b. 将制片机温度调至45℃，将标记好的玻片置于玻片架上。每张玻片上滴100μl混合好的细胞悬液，下降梳齿（制片机一次可制6张玻片）。

10b. 运行制片机4～5min。取出玻片，从玻片边缘吸干残余液体。在相差显微镜下观察分裂相分散铺片情况。玻片染色前于65℃恒温箱中过夜或90℃恒温箱中10min。进行第12步。

12. 用胰酶-吉姆萨显带法对染色体染色（单元4.3）。对7～10个中期分裂象进行结果分析。

参考文献：Brambati *et al.*，1987

编者：Laird Jackson，Longina M. Gibas，and Marie A. Barr

单元 8.2　羊水标本的制备、培养和分析

注意：为确保每例标本培养成功，可采取每例标本用两种不同的大量培养基，每种要含独立分装的多量胎牛血清（FBS）。而且这两种方案最好放在有独立的 CO_2 供源的不同培养箱中培养。

注意：如无特殊要求，所有的培养都必须在37℃、含5%CO_2 且湿润的培养箱中进行。

基本方案　原位培养法对羊水标本的制备、培养、收获和分析

材料（标√的条目参见附录1）

10～20ml羊水
95%乙醇
√20% Chang培养基，室温和37℃
10mg/ml秋水仙胺（如Life Technologies）
低渗液：0.075mol/L KCl或0.7%（*m/V*）枸橼酸钠
6：1和3：1（*V/V*）甲醛/冰乙酸固定剂（ACS级，每日新鲜配制）
Permount封固剂
可用于细胞培养的20ml注射器或试管
15ml离心管
离心机（如Fisher Marathon 21K，4臂转头）
$22mm^2$ 盖玻片（no.1；Becton Dickinson Clay Adams Gold Seal或Corning），95%乙醇浸泡过夜
9in（23cm）巴氏吸管，高压灭菌
倒置显微镜
精细镊
蓝垫或纸巾
60℃玻片加热器
红色绘图铅笔
3in×1in×1mm显微镜玻片（Curtin Matheson）

1. 将羊水置于可用于细胞培养的20ml注射器或试管中。样品处理前应室温下放置，不要将样品冻存或置于热环境中，因为极端的温度对细胞生长有害。

   14个孕周后的羊膜腔穿刺可获得的羊水样本量大约为20ml，14周之前约为10ml。大致的规律是每增加一个孕周可多获得1ml羊水样本。得到羊水样本后应当天处理。

2. 轻轻混匀含有羊水样本的试管以使细胞悬浮。
3. 对于多于15ml的样本，平均分装至两个15ml离心管；少于15ml的样本直接转入

15ml 离心管。室温下 109g 离心 10min。

4. 在离心过程中标记好 35mm 培养皿的皿盖和皿底。常规羊膜腔穿刺（14～22 个孕周）获得的羊水样本需用 5 个培养皿，过早或过晚的羊膜腔穿刺（分别为早于 14 个孕周或晚于 22 个孕周）获得的羊水样本可用 4 个培养皿。
5. 火焰灭菌并烧干 $22mm^2$ 的盖玻片（确保完全干燥），每个培养皿中放入一个，仅余最后一个培养皿不放。
6. 从离心机中取出离心管，小心不要搅动沉淀与离心管底部的细胞。吸去上清，留细胞沉淀上方约 1ml 上清液。将上清移入另外的试管 4℃保存以备生化检测。

常规羊膜腔穿刺获得大于 15ml 羊水样本的处理

7a. 用 0.7ml 室温下 20% Chang 培养基轻轻重悬两管细胞沉淀中的一管。轻轻吹打试管边缘使细胞沉淀重悬。平均分配细胞悬液滴于第一个和第二个培养皿中间的盖玻片中央。仔细操作，确保细胞悬液滴于盖玻片上。

8a. 用 1.2ml 室温下 20% Chang 培养基轻轻重悬第二管细胞沉淀。将细胞悬液平均分于剩下的三个培养皿中，仍需仔细操作，确保细胞悬液滴于第三个和第四个培养皿中的盖玻片上。

9a. 在第五个培养皿中加入 2ml 室温下 20% Chang 培养基（单层培养）。培养 24～72h。

过早羊膜腔穿刺所得羊水样本或任何小于 15ml 的羊水样本的处理

7b. 如步骤 7a，于细胞沉淀中加入 1.6ml 室温下 20% Chang 培养基，轻轻重悬细胞。

8b. 将细胞悬液平均分于 4 个培养皿中（见第 5 步）。仔细操作，确保在前三个培养皿中细胞悬液全部滴在盖玻片上。

9b. 在第 5 个培养皿中加入 2ml 室温下 20% Chang 培养基（单层培养）。培养 24～72h。

过晚羊膜腔穿刺所得羊水样本的处理

7c. 如步骤 7a，每个试管中加入 0.7ml 室温下 20% Chang 培养基，轻轻重悬细胞沉淀。

8c. 将一管中的细胞悬液平均分于第一个和第二个培养皿中，每个皿中均有一盖玻片。

9c. 将另一管中的细胞悬液平均分于第三个和第四个培养皿中，一个皿中有盖玻片，一个皿中没有（单层培养）。单层培养的皿中加入 2ml 室温下 20% Chang 培养基。培养 24～72h。

10. 在有盖玻片的培养皿中加入 2ml 预热的 20% Chang 培养基。培养 2d。
11. 用连有负压抽吸装置的高压灭菌巴氏吸管吸去培养基。吸管应围绕培养皿周围抽吸以免搅乱细胞。
12. 加入 2ml 预热的 20% Chang 培养基，继续培养。第一次换液后，基本每周换液一次。收获当天不要换液，这样就不至于破坏活跃分裂的细胞，使其更少的贴壁。最好于收获前 24～48h 换液一次以促进细胞更好的生长。如果培养出现特殊的“junky”或血染，那么在吸去培养基之前轻轻振荡培养皿。
13. 培养第 5 天，倒置显微镜下观察原代培养周期中克隆形成情况及细胞生长情况。传代 24h 后开始检查传代培养情况。

原代细胞建立在培养第一天。大部分原代培养可于培养 5～9d 收获。细胞培养 5d 以后克隆形成，细胞有丝分裂活跃，生长旺盛。倒置显微镜下可观察到折光性双联体出现。当有显著数量的有丝分裂双联体出现在细胞克隆的周围且它们之间仍有足够空间以区分相互独立的克隆时就可以收获细胞了（支持方案 1）。

14. 每个皿中加入 50μl 10mg/ml 秋水仙胺。轻轻转动培养皿混匀。孵育 20min。
15. 从培养箱中取出培养皿，沿培养皿内缘轻轻加入 1ml 低渗液。放置 10～12min。
16. 用巴氏吸管沿培养皿边缘小心吸去低渗液及培养基混合液。如第 15 步，再加入 2ml 低渗液，放置 12min。
17. 沿培养皿内缘轻轻加入 1ml 新鲜配制 6∶1 固定剂，放置 10min。然后沿培养皿边缘小心吸去固定液及低渗液混合液。
18. 加入 2ml 新鲜配制 3∶1 固定剂。固定 12min 后吸去固定剂。重复该方案 2 或 3 次，每次固定 10min。最后不要移去固定剂。
19. 用精细镊从培养皿中取出盖玻片，用吸水纸巾沿盖玻片边缘吸去盖玻片上多余的固定剂。轻吹盖玻片细胞面。将盖玻片倾斜（细胞面朝上），靠在 35mm 培养皿盖的边上，培养皿盖则放在湿的蓝垫或湿的纸巾上，以便在干燥处理开始前维持湿润环境（图 8.2.1.A）。在湿垫或纸巾上放置 2～3min。

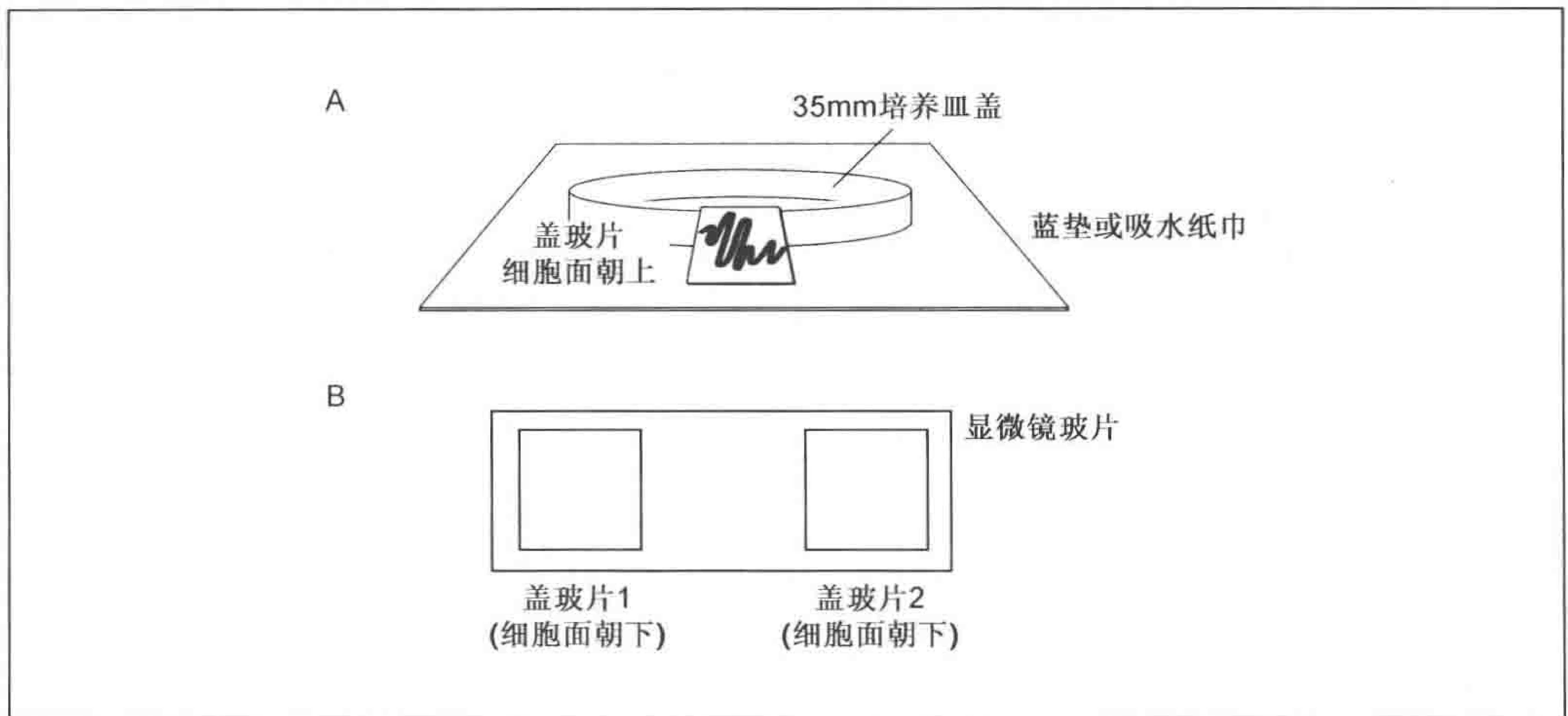


图 8.2.1　羊水样本细胞培养中盖玻片的放法。A. 斜靠在 35mm 培养皿盖边缘使盖玻片干燥（细胞面朝上）；B. 两张盖玻片（细胞面朝下）封固于一张显微镜玻片上。

20. 将盖玻片倾斜（细胞面朝上），靠在 35mm 培养皿盖的边上，置于 60℃玻片加热器上直至玻片干燥（约 10min）。当玻片完全干燥时，用拇指和食指夹住玻片，用红色绘图铅笔轻轻在玻片背面做标记。
21. 盖玻片细胞面朝上倾斜放置于 60℃玻片加热器上至少 4h，但不能超过 24h。立即以 GTG 显带或在显带前室温下放置，放置时间不超过 2 周。
22. 用标准方法及时间在染缸中对盖玻片进行染色（单元 4.3）。参照第一次 GTG 显带的指导说明，用 0.025%（*m*/*V*）胰酶消化 1.5～2min，4%（*m*/*V*）吉姆萨染液染色 5min。

23. 盖玻片染色且完全干燥后，每张盖玻片用 1 或 2 滴 Permont，将盖玻片的细胞面朝下封固于标记好的 3in×1in×1mm 显微镜玻片上。每张玻片上放两张盖玻片（图 8.2.1.B）。
24. 开始分析第一张盖玻片。选择染色体分散良好且比较完整（如绝大部分应该齐具 46 条染色体）的细胞进行计数。整个分析流程概况见图 8.2.2。

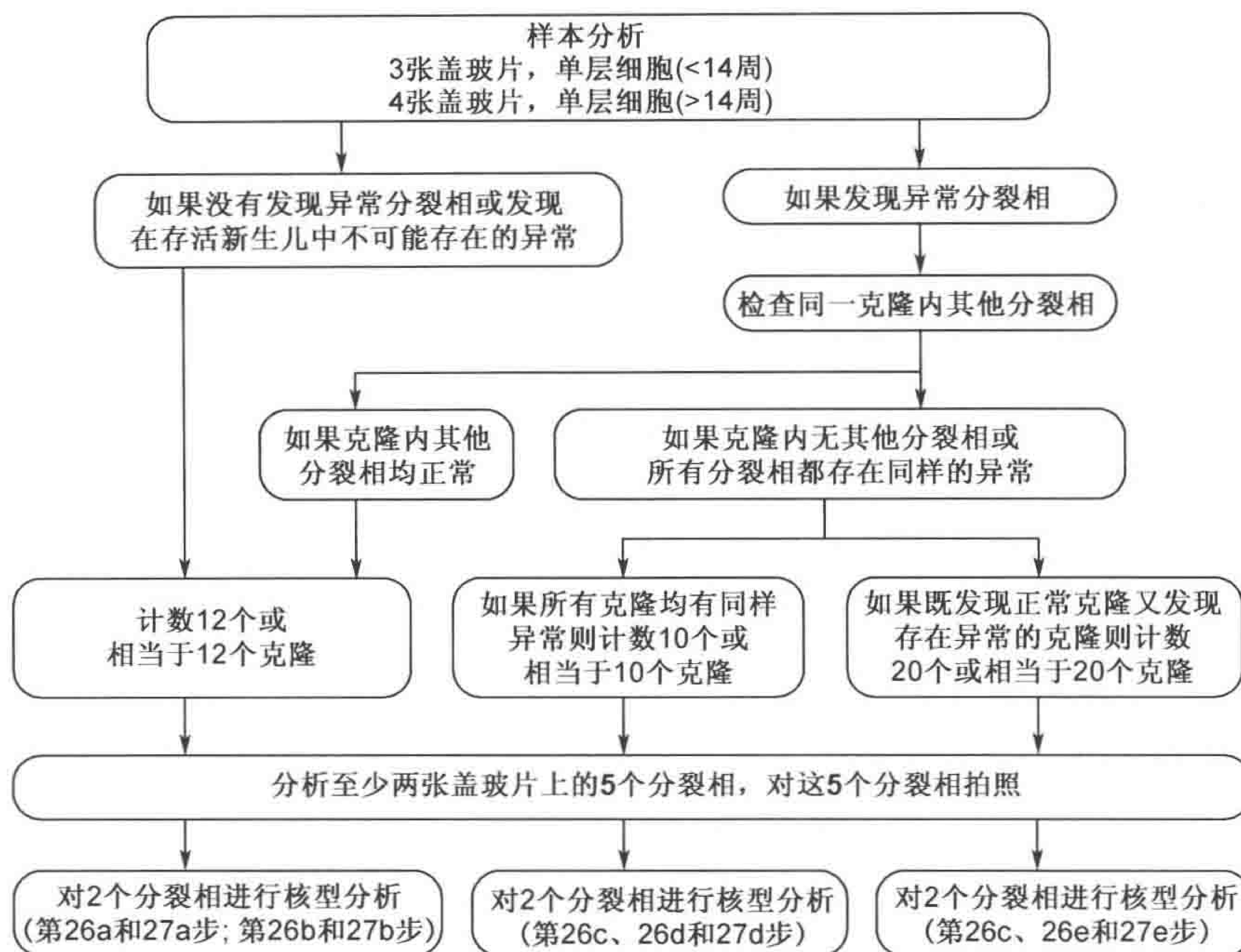


图 8.2.2 羊水样本分析流程图。这里所指的异常分裂相是指 A. 8、9、13、18 或 21 号染色体三体；B. 性染色体非整倍体；C. 标记染色体；D. 不平衡结构重排。经 Frederick R. Bieber，Brigham&Women's Hospital，Boston 允许修改。

25. 记录克隆数和每个计数及分析的中期分裂相的坐标位置。每个克隆最少选择一个中期分裂相进行显微镜检。

如果没有发现异常细胞

26a. 如果无异常发现，则要选择至少两张盖玻片总共计数 12 个克隆，分析 5 个中期分裂相。

计数原代培养的 12 个正常克隆应除去那些在 95%可信区间内细胞嵌合大于 25%的克隆。如果原代细胞不足 12 个克隆，也可计数传代细胞以补足。但计数传代细胞两个克隆相当于计数原代细胞一个克隆。因此，在正常情况下，应计数经折算后相当于 12 个原代细胞的克隆，如原代细胞计数 12 个克隆、传代细胞计数 24 个克隆或原代与传代相混合折算后相当于 12 个原代细胞克隆。

27a. 将这 5 个中期分裂相拍照，并对一个中期分裂相进行核型分析。

其中一张用于核型分析的盖玻片用溴化乙锭（EB）收获效果更好（支持方案 1）。在一个核型中，每一条染色体的每个条带均应清晰可见，且不能与其他染色

体交叉重叠。如果一个分裂相不能满足这些要求，可用从其他分裂相来的清楚的染色体对这个核型一些被压的染色体的某些条带补充，它也应该包括在这个核型内。这些外来的染色体对应标注在该核型受压染色体的旁边，且应指明它来自哪个分裂相。

如果发现异常细胞

26b. 检查同一克隆其他分裂相。如果其他分裂相均正常，选择至少两张盖玻片总共计数 12 个克隆，分析 5 个中期分裂相。
27b. 将这 5 个中期分裂相拍照，并对两个中期分裂相进行核型分析。

如果发现一个异常细胞且在同一个克隆内没有其他分裂相或同一个克隆内所有分裂相均为同样的异常（非嵌合）

26c. 检查其他克隆有无该异常。

如果所有克隆内都存在相同异常的细胞（培养无嵌合）

26d. 选择至少两张盖玻片总共计数 10 个克隆（或相当于 10 个的克隆），分析 5 个中期分裂相。
27d. 将这 5 个中期分裂相拍照，并对两个中期分裂相进行核型分析。

如果仅有部分克隆内存在异常细胞（培养有嵌合）

26e. 选择至少两张盖玻片总共计数 20 个克隆（或相当于 20 个的克隆），分析 5 个中期分裂相（一个细胞株分析两个分裂相，另一个细胞株分析三个分裂相）。
27e. 将这 5 个中期分裂相拍照，并对两个中期分裂相进行核型分析（每个细胞株一个）。

如果在两个或更多的培养皿中发现同样的异常则诊断为真性嵌合体（例如，原位培养法中的组织培养皿或培养瓶培养法中的培养瓶，见备选方案 1），如果某种异常仅在一个培养皿中发现，即便是在原位培养时该异常存在于不同的克隆中，也诊断为假性嵌合体，因为有丝分裂的细胞不贴壁，所以可以在培养皿内移行至其他克隆。

支持方案 1　溴化乙锭法高分辨染色体显带的收获

该方法用于获得比标准收获方法更长的分裂中期染色体（常规方法染色体可显 500 条带，该方法可显 800 条带）。更多的条带可用于鉴别更加微小的染色体异常，但更长的染色体不宜分散，且更容易与其他的染色体交叉重叠。为了更加全面的分析，可用两种方法同时收获细胞。

附加材料（标√的条目参见附录 1）

已培养好的细胞（基本方案）
√0.5mg/ml 溴化乙锭（EB）

1. 在准备收获（如基本方案第 13 步）的培养皿中加入 25μl 0.5mg/ml 溴化乙锭（EB），孵育 70min。
2. 加入 50μl 10mg/ml 秋水仙胺，孵育 20min。
3. 从基本方案第 15 步开始收获细胞。

支持方案 2　单层细胞培养的细胞传代

如果从盖玻片上收获的细胞数量不足以进行分裂中期染色体分析，可将单层贴壁培养的细胞传代至新的盖玻片，从传代细胞获得更多的有丝分裂相。

附加材料（标√的条目参见附录 1）

可供传代的单层贴壁培养细胞（基本方案）
√无钙无镁 HBSS，37℃
胰酶/EDTA 溶液：0.05%（*m/V*）胰酶/0.53mmol/L EDTA · 4Na（Life Technologies），37℃

1. 倒置显微镜下扫描待传代的单层细胞（如基本方案第 10a、10b、10c 步）。放大 40 倍时一个视野的细胞足以覆盖一张盖玻片，由此计算确定待传代的单层细胞所需用的盖玻片数量。

   若单层细胞仅有一个克隆则不进行传代，除非该克隆的大小恰好合适传代至一张玻片上（如布满显微镜 40 倍一个视野）。
2. 将灭菌且完全干燥的盖玻片置于标记过的 35mm 培养皿中。
3. 吸去培养皿中的培养基。用 2ml 预热 HBSS 洗涤细胞以完全去除培养基。
4. 吸去 HBSS，加入 0.5ml 预热的胰酶/EDTA 溶液，孵育 3～4min。
5. 倒置显微镜下观察细胞游离情况，细胞应变为圆形且呈漂浮状态。如果所有细胞均未游离，敲击培养皿底部，若细胞仍未游离，则多孵育 1min。
6. 加入足量已预热 20% Chang 培养基使每个皿中达到 0.5ml 液体。用吸管上下吹打细胞以打散细胞团。
7. 每个盖玻片上滴 0.5ml 细胞悬液，在原代单层细胞上加入 2ml 已预热 20% Chang 培养基。
8. 所有培养皿至少培养 2h。若传代进行较晚，则培养过夜。
9. 在含有盖玻片的培养皿中加入 2ml 已预热 20% Chang 培养基。

   如果用 $25cm^2$ 培养瓶进行传代培养，则需要 5ml 细胞悬液。一个皿中已铺满的单层细胞可传代至一个 $25cm^2$ 培养瓶中（支持方案 3）。培养瓶培养细胞时细胞应为悬液且平铺于最终体积的培养基中，因为它们将利用整个容器的底部作为生长表面。

备选方案　培养瓶培养法对羊水标本的制备、培养、收获和分析

该方法较原位培养法需较长时间，但由于培养基较多，因此可获得更多的分裂相。

附加材料（参见基本方案）

胰酶/EDTA 溶液：0.05%（*m/V*）胰酶/0.53mmol/L EDTA · 4Na（Life Tech-

nologies)，37℃

$25cm^2$ 组织培养瓶（Falcon；Fisher）

1. 将羊水标本转移至 15ml 离心管，按照基本方案中第 1～3 步进行离心。
2. 离心时标记 $25cm^2$ 培养瓶。常规羊膜腔穿刺（14～22 孕周）获得的羊水样本需用 3 个培养瓶，过早或过晚的羊膜腔穿刺（分别为早于 14 孕周或晚于 22 孕周）获得的羊水样本可用两个培养瓶。
3. 从离心机中取出离心管时注意不要搅乱细胞沉淀。吸去每个离心管中的上清，留约 1ml 液体于细胞沉淀上。将上清转移至其他试管以备生化检测（检测 AFP 需 4℃保存）。
4. 如果液体分至两个离心管，则用 3ml 已预热的 20% Chang 培养基将第一管细胞沉淀重悬，轻轻敲击离心管边缘使细胞沉淀悬浮，然后将第一管的细胞悬液转入第二管，重悬第二管细胞沉淀。若液体仅有一管，则用 3ml 已预热的 20% Chang 培养基重悬细胞沉淀，轻轻敲击离心管边缘使细胞沉淀悬浮。
5. 将细胞悬液平均分至培养瓶中。加入已预热的 20% Chang 培养基使每个培养瓶中液体终体积为 5ml。培养 4～6d。
6. 用连有负压抽吸装置的高压灭菌巴氏吸管吸去培养基。倾斜培养瓶，使吸管置于培养瓶一角吸去培养基以免搅动细胞。
7. 在培养瓶中加入 5ml 已预热的 20% Chang 培养基继续培养。尽量不触动培养瓶，但至少每周更换一次培养基（当培养基变黄时）。
8. 培养 5～6d 后应定期于倒置显微镜下观察细胞生长情况。当有显著数量的有丝分裂双联体出现在细胞克隆的周围，且它们之间仍有足够空间以区分相互独立的克隆时就可以收获细胞了（通常为 6～12d）。如果培养瓶细胞生长过于旺盛，则可将细胞传代至多个培养瓶中（支持方案 3）。
9. 收获前 12～22h 营养培养。准备收获细胞时，每个培养瓶中加入 100μl 10mg/ml 秋水仙胺，孵育 20min。不要将一个样本所有的培养瓶全部用于收获。始终保留一瓶备用以便当需要更多材料时可用于传代。
10. 从培养瓶中吸去培养基。用 2ml 预热的胰酶/EDTA 溶液洗涤培养瓶彻底去除培养基，将洗脱液置于一个 15ml 离心管中以备第 14 步所用。
11. 在培养瓶中再加入 2ml 预热的胰酶/EDTA 溶液，孵育 5min。
12. 倒置显微镜下观察细胞游离情况，细胞应变为圆形且呈漂浮状态。如果所有细胞均未游离，敲击培养瓶底部，若细胞仍未游离，则多孵育 5min。
13. 加入 2ml 已预热的 20% Chang 培养基洗刷培养瓶表面细胞。用吸管上下吹打细胞以打散细胞团。
14. 将细胞悬液转入含有 2ml 第 10 步中洗涤培养瓶的胰酶/EDTA 溶液的离心管中，室温下 109g 离心 10min。
15. 离心细胞后，倒去上清（或小心吸去），仅留少量液体（<0.5ml）以重悬细胞沉淀。
16. 一滴一滴地加入 1ml 预热低渗液，使液体缓慢滑入管底。轻轻敲击以混匀。然后再加 6ml 预热低渗液，在低渗液与细胞混悬液接触前仍应使液体缓慢滑入管底。盖上离心管盖，培养 10min。

17. 加入 5 滴新鲜配制 3∶1 固定剂，轻轻倒转离心管以混匀。室温下 70g 离心 10min。
18. 倒去或小心吸去上清，一滴一滴地加入 1ml 3∶1 固定剂，使其缓慢流入管底。轻轻重悬细胞沉淀，小心不要让细胞在离心管内飞溅。
19. 加入 6ml 3∶1 固定剂，使其缓慢流入管底。盖上离心管盖，－20℃冻存超过 30min。
20. 70g 离心 10min。移去上清，再加入 7ml 3∶1 固定剂。第 1ml 应一滴一滴缓慢加入，轻轻混匀，然后再加入剩余的 6ml。
21. 重复第 20 步，更换固定剂 3 或 4 次（对于那些培养中可看到碎片或以前制备的分裂相周围胞质未除净，于染色体周围着色者）。
22. 最后一次更换固定剂后余少量固定剂以重悬细胞沉淀（通常约为 0.5ml）以使滴片的细胞悬液达到预期的浓度（单元 4.1）。
23. 每个培养瓶的细胞制备 3～5 张玻片，每张玻片 10～30 个分裂相，GTG 显带法进行染色（单元 4.1 和单元 4.3）。按照指导说明，第一次显带时在 0.025%（m/V）胰酶中消化 1.5～2min，在 4%（m/V）吉姆萨染液中染色 5min。
24. 开始分析第一张玻片。选择染色体分散良好且比较完整（如绝大部分应该具齐 46 条染色体）的细胞进行计数。

如果没有发现异常细胞

25a. 计数 20 个细胞，理想情况下应 2 个培养瓶各计数 10 个细胞。显微镜下分析 5 个分裂相。如果羊水样本体积≥16ml，则应排除那些在 95%的可信区间内嵌合程度大于 20%的细胞。

26a. 将这 5 个中期分裂相拍照，并对一个中期分裂相进行核型分析，见基本方案第 26、27 步，用于核型鉴定及讨论。

如果在所有细胞中均发现同一异常

25b. 计数 10 个细胞，至少计数一个来自第二个培养瓶中的细胞。分析 5 个分裂相。

26b. 将这 5 个中期分裂相拍照，并对一个中期分裂相进行核型分析。

如果仅发现一个核型有数目异常

25c. 收获第三个培养瓶培养的细胞，在没有发现该异常的两个培养瓶中计数 20 个中期分裂相。分析 5 个分裂相（一个细胞株分析两个分裂相，另一个细胞株分析三个分裂相）。

如果在这两个培养瓶培养的细胞中均没有发现该异常，则结果应解释为假性嵌合或培养过程中人为原因造成。如果这两个培养瓶培养的细胞中有一个也发现了该异常，则解释为真性嵌合。

26c. 将分析过的分裂相拍照并在每个细胞株选取一个核型进行核型分析。

如果仅发现一个核型有结构异常

25d. 在第二瓶细胞中计数 20 个细胞，注意有无该异常。分析 5 个分裂相（一个细胞株

分析两个分裂相，另一个细胞株分析三个分裂相）。

如果在第二瓶细胞中没有发现该异常，则结果应解释为假性嵌合。如果第二瓶细胞中也发现了该种异常，则结果应解释为真性嵌合。

26d. 对每个细胞株中的 5 个分裂相拍照，每个细胞株选取一个核型进行核型分析。

支持方案 3　培养瓶培养细胞的传代

1. 当培养细胞已生长至足以传代，铺满或接近铺满培养瓶（备选方案，第 8 步），吸去培养瓶中培养基。
2. 用 2ml 预热的胰酶/EDTA 溶液洗涤培养瓶彻底去除培养基，以免培养基影响胰酶活性，将洗脱液置于一个 15ml 离心管中。
3. 在培养瓶中加入 2ml 预热的胰酶/EDTA 溶液，孵育 5min。
4. 倒置显微镜下观察细胞游离情况，细胞应变为圆形且呈漂浮状态。如果所有细胞均未游离，敲击培养瓶底部，若细胞仍未游离，则多孵育 5min。
5. 加入 2ml 已预热 20% Chang 培养基洗刷培养瓶表面细胞。用吸管上下吹打细胞以打散细胞团。
6. 将细胞悬液转入含有 2ml 前面步骤中用于洗涤培养瓶的胰酶/EDTA 溶液的离心管中，室温下 109*g* 离心 10min。
7. 倒去上清（或小心吸去），用预热 20% Chang 培养基重悬细胞。重悬细胞所需加入的培养基体积视需要传代多少个培养瓶而定。
8. 培养细胞，按照备选方案第 8～26 步收获细胞。

参考文献：Hsu *et al.*，1992

编者：Patricia Minehart Miron

单元 8.3　用于染色体分析的妊娠产物及其他固体组织来源样本的培养及制备

在临床中染色体的研究通常需要用除肿瘤组织外的一些固体组织，这是基于以下两个原因之一：一些患者只能通过组织活检获得固体组织样本，或者因为怀疑有嵌合现象需取组织而不是取标准的外周血淋巴细胞进行检测。

注意：处理活细胞的所有试剂和仪器均必须是无菌的。如无特殊要求，所有的培养都必须在 37℃、含 5%CO_2 且湿润的培养箱中进行。

基本方案　用于分裂中期染色体分析的组织样本的器械法破碎和培养

材料（标√的条目参见附录 1）

组织样本：2～3mm^3 胚胎组织，活检取得的直径 2mm、深 2mm 的皮肤，或活检取得的 3mm^3 的组织，取新鲜标本或保存于 4℃的标本（支持方案 1 和支持方案

2)

√含标准抗生素的 HBSS 溶液，如 Life Technologies 的 PSN 抗生素混合液，5 倍浓度（−55℃冻存或启用后 4℃保存）

完全培养基/15%～20%FBS（附录 1；最好是 Life Technologies 的、补充有 Ham F-10 或 a-MEM 的）

35mm 培养皿

解剖器械：针、解剖剪、精细镊、解剖刀

25cm² 塑料组织培养瓶

1. 用无菌解剖器械将组织标本放入含有 5ml HBSS 及 5 倍浓度抗生素的 35mm 培养皿中。室温下放置≥30min。
2. 将组织标本转移至一个新的含有约 2ml 完全培养基/FBS（补充培养基，如 Chang 培养基，单元 8.2 或 Irvine Scientific，可加快生长速度）。用精细解剖剪和精细镊或用解剖刀将组织切碎为细小的碎片。
3. 用无菌巴氏吸管将组织碎片和尽可能少量的完全培养基/FBS（每个培养瓶约 1ml）转入 2 或 3 个 25cm² 塑料组织培养瓶中，将组织碎片平均分布到整个培养瓶底（最宽的面）。
4. 小心将培养瓶直立（底面垂直，盖朝上），旋紧瓶盖，培养数小时或过夜。
5. 从培养瓶中组织细胞面的相对面加入 4ml 完全培养基/FBS，小心操作注意不要搅动贴壁的组织碎片，旋紧瓶盖（防止污染），将培养瓶平放（使组织贴壁的面保持水平），培养 2d。
6. 检查植株是否有污染，培养液变混浊、培养液酸性变强或有明显的真菌生长均提示有污染。如果没有污染迹象，将培养瓶盖旋松继续培养。
7. 5d 后（至 3 周）检查植株生长情况，如可看到少量细胞，通常为成纤维细胞，在组织碎片周围生长。

   羊膜或一些其他组织培养的细胞可为上皮细胞而不是一般情况下的成纤维细胞。这些细胞（包括成纤维细胞）均不耐胰酶，因此若需制备染色体涂片需尽早收获。

8. 细胞生长过程中每周更换培养基两次。如果可能的话冲洗掉大的组织移植片，当数个克隆生长良好且已经进入指数生长期（如有丝分裂细胞呈圆形且游离，克隆间有充足空间）时，可从原代培养直接收获细胞并按照培养瓶培养羊水的方法（单元 8.2）制备分裂中期染色体涂片。对染色体涂片进行染色（单元 4.3）并分析核型（附录 3K）。

备选方案 1　用于分裂中期染色体分析的组织样本的酶裂解法和培养

附加材料（标√的条目参见附录 1）

√胶原酶溶液

√胰酶/EDTA 溶液

15ml 离心管

20G 针头或精细巴氏吸管

IEC 离心机或同等设备

1. 将待检组织分别放入 35mm 培养皿中（每种组织放一个皿）。加入 1ml 胶原酶溶液，消化 1h。
2. 用吸管或注射器将含有松解细胞的胶原酶溶液转移至一个 15ml 无菌离心管中。盖上离心管盖，室温下放置。在培养皿剩余组织中加入 1ml 胰酶/EDTA 溶液，消化 1h。
3. 用一个连有 20G 针头或精细巴氏吸管的注射器上下吹打皿内液体，将仍聚集的细胞团打散。将细胞悬液转移至第 2 步中含有细胞悬液的离心管。
4. 加入完全培养基/FBS 至 12ml。室温下 70g 离心 8min。弃去上清，用 1～2ml 完全培养基/FBS 重悬细胞沉淀。
5. 按照羊水培养方法将细胞悬液滴至 4 张盖玻片上或分至两个 25cm^2 培养瓶中培养，1d 后检查有无污染。收获前营养培养，按照原位培养法或培养瓶培养法制备分裂中期染色体涂片（单元 8.2）。对染色体涂片进行染色并分析核型。

支持方案 1　妊娠产物标本的培养

材料（标√的条目参见附录 1）

妊娠产物

√ HBSS 或 Ringers 溶液

解剖器械：针、解剖剪、精细镊、解剖刀

解剖显微镜

塑料无菌培养皿或不锈钢容器

1. 将妊娠产物标本置于无菌或干净的密闭容器内运送。
2. 若立即处理标本，则不需要加入额外的液体，因为标本本身已含有足够的液体以维持其湿润。若标本不能立即处理，则需在 24h 内处理，标本于 4℃保存不得超过 5d。不要加入额外液体，不可冻存标本。

3a. 对于较大的且完整的标本，若胎儿部分较易辨别，比如整个的或大块碎裂的胚胎，则从容器中小心取出标本的胎儿部分置于一大小合适的塑料无菌培养皿或不锈钢容器中。还应仔细寻找胎盘及胎膜碎片。

注意：虽然大部分样品未灭菌，所以真正的灭菌是不可能的，但是所有培养皿和设备都要清洁并用酒精灭菌。

3b. 对于较小的或部分的标本，则直接将全部样本置于一较大培养皿中。用解剖针或精细镊仔细分离标本，寻找小的胚胎或胚胎部分以及胎盘、胎膜和脐带碎片。

标本中的大部分可能为母体蜕膜，蜕膜组织不能反映胎儿的基因型，因此不能用。蜕膜组织外观也是膜状的，与胎膜相似（如羊膜与绒毛膜），但蜕膜组织非常脆。如果需要可用解剖显微镜观察可疑的胎盘或胚胎组织的碎片以确定它们的来源。胎盘有绒毛分支，可以此区别胎盘与蜕膜。

在较早期且完整的标本中，胚胎组织有可能被完全包裹在绒毛和（或）蜕膜内，则需要切开标本以寻找胚胎组织。

在一些不完整的标本中也有可能无法找到胚胎组织。

4. 如果标本为新鲜的未软化的胎儿，则从四肢采集 2～$3mm^3$ 的肌组织进行培养。如果为防止可能存在的嵌合现象而需要从其他器官取材，而皮肤、肾脏、肺脏和（或）肝脏这些器官的组织均可用于培养。如果标本为新鲜的小胚胎，则一次检查或拍照取整个样本的 2～$3mm^3$ 的一部分。如果胚胎或胎儿已软化，则取 2～$3mm^3$ 的胎膜或绒毛碎片。

在很多自然流产及部分人工流产中，胚胎或胎儿可能在排出前数天已经死亡，这将导致胚胎标本变色、质脆且质软（已软化），这样的胚胎标本通常不能达到足够数量的活力细胞用于培养。在这种情况下蜕膜组织——胎膜及绒毛通常更有活力。

支持方案 2　皮肤或其他活检组织标本的培养

材料（标√的条目参见附录 1）

待培养组织
√HBSS 的
解剖器械：无菌解剖剪和精细镊或解剖刀

无菌操作收集活检组织。用无菌精细镊和精细剪或解剖刀仔细修剪脂肪组织。将活检组织置于含有足以覆盖组织的 HBSS 或无补充培养基的无菌离心管中，如需保存则于 4℃保存，不可冻存标本。

如需活体取材培养成纤维细胞，通常情况下采取皮肤活检，需采取直径 2mm、深 2mm 的皮肤组织。外科手术时则可获得其他来源的组织标本（筋膜或其他结缔组织最易培养）；在某些特殊情况下需要研究一些特殊组织（如性染色体嵌合病例中的性腺组织活检）。这些组织活检需采取约 $3mm^3$ 的一小片。如果是死产或新生儿死亡病例的尸检，则可获得较大部分的组织用于培养。如果没有其他需特别考虑的因素，深部肌肉组织为最佳选择。因为深部肌肉组织较皮肤组织不易被污染，且可以在机体死亡后 5～7d 仍有活力。

标本现在可用于制备分裂中期染色体涂片的培养了。培养 3～4d 后应检查植株向外生长的情况。

绒毛标本直接制备法

从自然流产或人工流产中取得的绒毛组织可用于直接制备分裂中期染色体涂片。从绒毛膜绒毛活检中获取绒毛组织，按照单元 8.1 中的描述直接制备分裂中期染色体涂片。按照单元 4.3 及附录 3K 中的描述进行染色和核型分析。

这样的制备方法不能获得大量的分裂相且质量不高。但比起以上描述的方法，该方法不需大量培养基及很长的培养时间，且不会有因母体来源细胞的过度生长而导致误诊的可能。直接制备法制备的染色体玻片亦可用于间期核原位杂交来筛查一些非整倍体（单元 4.4）。

参考文献：Lee，1991；Priest，1991；Rooney and Czepalkowski，1992

编者：Dorothy Warburton

单元 8.4　姐妹染色单体互换（SCE）分析

注意： 使用 BrdU、Hoechst33258 染料及吉姆萨染液时均用一次性乳胶手套。BrdU、Hoechst33258 染料均为光敏性材料。将所有容器，包括组织培养瓶、离心管和染缸，用锡箔纸包绕避光。对这些试剂进行操作时避免强光直射（如可借用邻近房间的灯光）或用被遮住的低瓦数的灯泡照明。

注意： 如无特殊要求，所有的培养都必须在 37℃、含 5% CO_2 且湿润的培养箱中进行。

基本方案　哺乳动物分裂中期染色体姐妹染色单体互换的分析

体细胞内姐妹染色单体互换（SCE）的细胞遗传学分析有两点要求：①有足量的活跃增殖细胞以提供足够数量的分裂相；②通过某些标记或染色方法能将姐妹染色单体区分开。该方法的原理见图 8.4.1，常见问题指导见表 8.4.1。

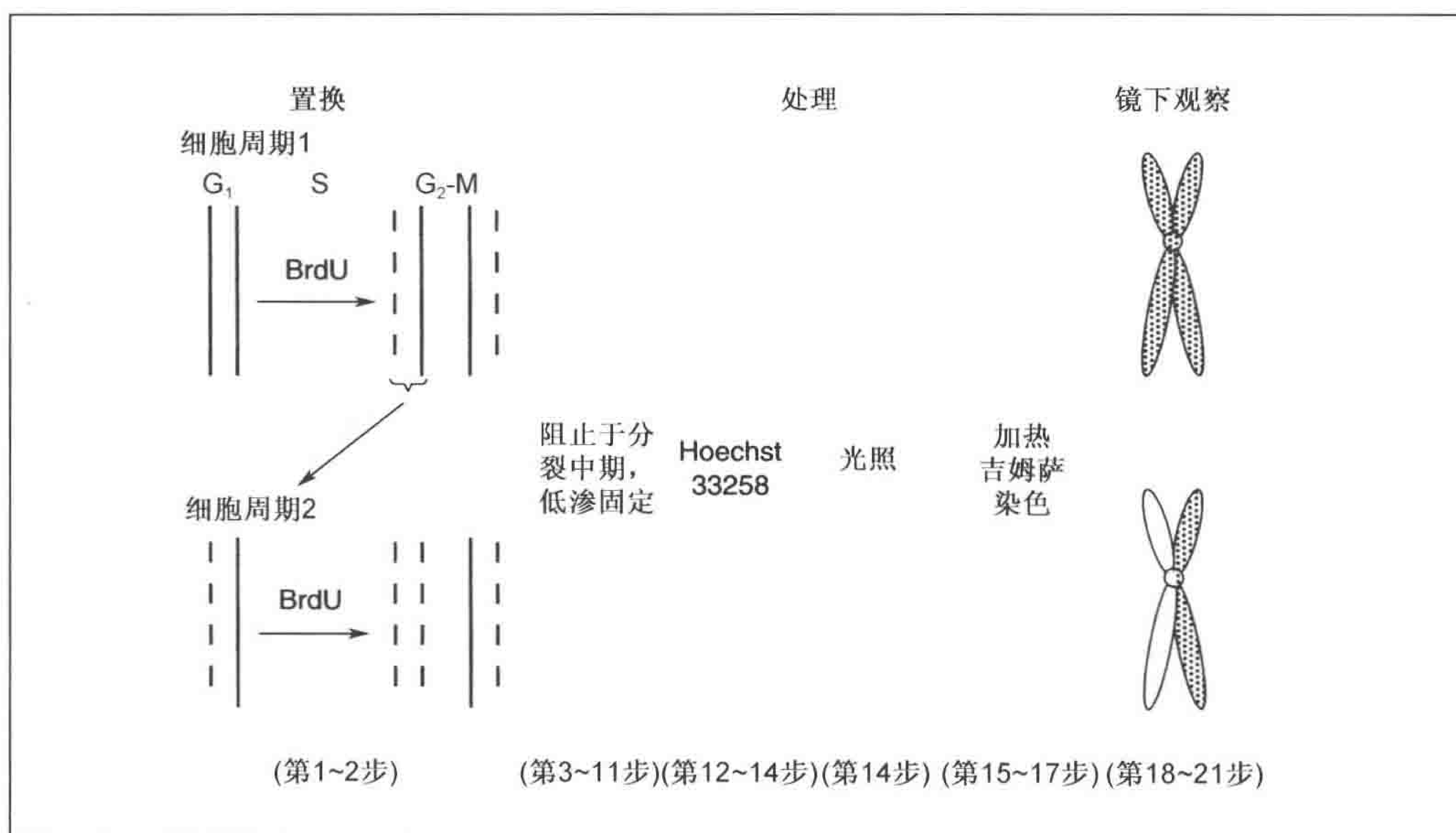


图 8.4.1　该图描述染色单体被分别染色的原理。在两轮完整的细胞周期中，新合成的 DNA 链中发生 BrdU 置换。如果已被 BrdU 置换的分裂中期染色体再用 Hoechst33258 荧光染料染色后进行曝光处理，经吉姆萨染色后，两条染色体单体均发生 BrdU 置换的染色体将显示比只有一条染色单体发生 BrdU 置换的染色体更加亮的特殊的紫红色。如果染色体的两条姐妹染色单体仅有一条发生 BrdU 置换或没有被 BrdU 置换的链，即细胞仅传代一次或在含 BrdU 环境中没有发生细胞分裂的周期，则将无法显示姐妹染色单体的差别。图中实线代表未被置换的 DNA 链，虚线代表被 BrdU 置换的 DNA 链。

表 8.4.1 姐妹染色单体互换分析中常见问题指导

问题	可能原因	解决方法
对照玻片有阳性结果而试验玻片染色体的姐妹染色单体着色无差别	BrdU 试剂问题或在 DNA 复制中用量不足	重新配置溶液或用新的足量试剂、增加 BrdU 用量
	特殊情况下一些细胞周期较长的细胞在含 BrdU 培养基中没有完成两轮复制，此时终止培养则导致试验失败	对于特殊细胞类型要确定细胞分裂周期的长短，相应调整在 BrdU 中培养的时间
三次分列细胞较多	细胞周期小于 24h	对于特殊细胞类型要确定细胞分裂周期的长短，相应调整在 BrdU 中培养的时间
对照组和试验组均无有差别分裂相	Hoechst33258 处理	配制新原液或用新的足量荧光染料；采用在试验中已证明可做出阳性结果的试剂
	曝光不充分	调整曝光时间（或）曝光光源强度
	吉姆萨染液用量的差异	调整吉姆萨染色用量或更换吉姆萨染液
姐妹染色单体有着色差异但两条染色均太紫	玻片染色过度	降低染色时间
姐妹染色单体有着色差异但两条染色均太浅	吉姆萨染液浓度和（或）染色时间不合适	提高吉姆萨染液浓度降低染色时间；或将玻片浸入水中洗净后再放入吉姆萨染液中复染 2min
深染和浅染的姐妹染色单体对比不明显	吉姆萨染液浓度和（或）染色时间不合适	提高吉姆萨染液浓度或增加染色时间
有丝分裂细胞和间期细胞吉姆萨染色过淡、模糊不清	曝光过度	降低曝光时间和（或）曝光光源强度

材料（标√的条目参见附录 1）

无菌肝素抗凝血

含促细胞分裂剂的培养基：完全 RPMI/15%FBS（附录 1），补充有 2%（V/V）植物凝集素 A（PHA；Life Technologies）

√2mmol/L 5-溴代-2′-脱氧尿嘧啶核苷（BrdU）原液

10μg/ml 秋水仙胺（如 Life Technologies，4℃保存）

低渗液：0.075mol/L KCl，37℃（4℃保存不得超过 2 周）

固定剂：3∶1（V/V）甲醛/冰乙酸（新鲜配制）

√250μg/ml Hoechst33258 原液

吉姆萨染液（哈利克改良天青蓝混合型，Baxter Scientific；Fisher；Gurr Improved R66，Bio/medical Specialties）

Gurr 缓冲液，pH6.8，粉片剂溶解（Bio/medical Specialties）

25cm² 组织培养瓶

15ml 锥底玻璃或聚丙烯塑料离心管

标准台式离心机

聚丙烯塑料吸管
清洁的显微镜玻片，用质软擦镜纸擦拭，室温下浸入水中待用
黑色塑料镜片盒（VWR Scientific）
24mm×50mm 盖玻片，使用前用质软擦镜纸擦拭
染缸
60W 白炽灯
37℃和 60℃水浴箱
乳胶黏合剂
解剖刀片
封固剂（如 Permount）
柯达 TMax100 专业胶卷

1. 将 0.3ml 无菌肝素抗凝全血加入含有 10ml 含促细胞分裂剂培养基的 25cm² 组织培养瓶中。培养 24h。
2. 于培养瓶中加入 50μl 新鲜解冻无菌 2mmol/L 的 BrdU 溶液使其终浓度为 10μmol/L（3μg/ml）。继续培养 48h。

   细胞必须在含 BrdU 的培养基中完成 2 轮 DAN 复制以获得预期的染色图，所以通过观察研究对不同类型细胞的细胞周期做出大致的估算是必要的。大部分哺乳动物细胞在培养过程中细胞周期为 24h；采用这个时间一般是可以获得成功的。

3. 于培养瓶中加入 150μl 10μg/ml 的秋水仙胺（终浓度 0.15μg/ml），孵育 30min。
4. 将培养产物转入 15ml 锥底塑料离心管，室温下 180*g* 离心 10min。移去上清，留约 0.2ml，轻轻敲击离心管使细胞沉淀重悬。

   贴壁培养的细胞须用胰酶消化下来后才能从培养瓶中转出。

5. 缓慢加入 6ml 37℃低渗液，同时轻轻振动离心管。37℃水浴箱中水浴 12min。
6. 于细胞悬液中加入 4 滴新鲜配制的固定液，同时轻轻敲击离心管。倒转离心管一次使其完全混匀。室温下 180*g* 离心 10min。
7. 移去上清，留约 0.2ml，轻轻敲击离心管使细胞沉淀重悬。加入 5ml 固定剂，开始一滴一滴地加入，然后快速加入，振动离心管使细胞一直保持悬浮状态。4℃下放置 20min。
8. 室温下 180*g* 离心 10min。移去上清，再加入 5ml 固定剂，轻轻混匀，室温下 180*g* 离心 10min。重复该步骤 2 或 3 次，直到细胞沉淀变为无色。
9. 移去上清，余少量固定液重悬细胞，使细胞成为稍混浊的细胞悬液。
10. 甩去显微镜玻片上多余水分。用塑料移液吸管吸取少许细胞悬液。吸管吸头应保持在玻片上方 2.5cm 的高度，每张玻片上滴 3 滴细胞悬液，每一滴都应滴在玻片表面的不同部位以使每滴细胞悬液都可以在玻片上充分展开。稍微倾斜玻片使其干燥。
11. 相差显微镜下观察，评价分裂相的质量和数量（如放大 16 倍观察）。室温下闭光放置玻片 2～3d 使玻片老化（如放入黑色塑料镜片盒中）。

    降低存放玻片的水温可减少染色体的过度分散。为得到分散良好的分裂相，如有必要可调整固定液的体积。过浓的细胞悬液使细胞丛集于玻片上，会干扰不同的染色。玻片准备的更多细节详见单元 4.1。

制备4张玻片以备不同的染色条件。剩余的细胞悬液可于5～10ml固定液中−20℃保存。今后如再需制备涂片，则将细胞悬液取出置于室温，离心后更换新的固定液。

12. 在9ml水中加入1ml 250μg/ml的Hoechst33258原液（4℃保存10～12d）。在染缸中加入49ml水和1ml稀释后的Hoechst33258溶液，染料终浓度为0.5μg/ml。
13. 将几张老化玻片放入含有Hoechst33258稀释液的染缸中，室温下放置12min。清水反复冲洗玻片。
14. 在每张湿的玻片上放置一张24mm×50mm盖玻片，用乳胶黏合剂密封盖玻片边缘。玻片置于60W白炽灯下方38cm（15in）处过夜。
15. 揭去乳胶黏合剂，用解剖刀片掀起盖玻片（而不是玻片）的一角将其翻转。将玻片交错置于已60℃预热2h的盛有水的染缸中，玻片间应留有空隙，放置10～12min。
16. 在一染缸中加入49ml Gurr缓冲液、pH6.8和1ml吉姆萨染液，放置于室温下。另外两个染缸中加入水用以洗脱，亦放置于室温下。
17. 从热水中取出一张玻片，在空气中晃动使其冷却并干燥，将其置于吉姆萨染液缓冲液中3.5min。依次将玻片移入另外两个盛水的染缸中，晃动玻片洗去残留的染液（当染缸中的水变得有颜色时需换水），在空气中晃动玻片使其干燥。
18. 高倍非油镜下观察细胞染色质量（如63×或80×）。明确判定至少在一些分裂相中姐妹染色单体是否可通过着色深浅不同加以区分。

    条件可以根据试剂的变化以及为了改进结果而微调（例如溶液的保存时间或试剂的批号，见表8.4.1）

19. 用适当的封固剂将制备最佳的染色体封固于盖玻片下。
20. 低倍镜下（如16×）推片寻找分散良好且完整的分裂相，当找到一个好的分裂相时转换至高倍镜（如100×或油镜）。鉴别姐妹染色单体着色是否不同，着色深浅的对比度是否能达到识别SCE的标准。扫视分裂相中每条染色体看其姐妹染色单体是否着色不同，以确定所有的染色单体片段均着色不同（即细胞在含BrdU培养基中复制没有超过2轮；见图8.4.1）。
21. 记录有意义染色的第二次分裂的细胞位于玻片上的位置（即记录显微镜载片台上的坐标）。计数并记录染色体及SCE的总数。继续找出15个有意义的细胞并记录。判定一个分裂相中SCE的范围和均值。选1或2个最佳细胞拍照以备进一步分析，采用如柯达TMax100专业胶卷那样高质量细颗粒胶卷。

    对于SCE发生率较高的分裂相，摄片（如5in×7in或13cm×18cm打印）有助于精确评分。在对分裂相进行拍照时，应在显微镜下对该核型再次审校，对比和确定交换的位点，SCE应用蜡笔在照片中标出。直接缩影复制和摄片相结合有助于确定位于着丝粒和端粒或其附近的相关SCE，且有助于检测发现靠在一起的互换，如Bloom综合征（BS）的特征。

参考文献：Latt *et al.*，1984；Perry and Wolff，1974

编者：James German and Becky Alhadeff

单元 8.5　利用石蜡包埋组织鉴定染色体非整倍体

病理检查对组织的处理大部分是采用福尔马林固定和石蜡包埋。这些石蜡包埋块可存放至少 20 年，这为进一步研究和发现潜在的有用信息提供了原材料。一般情况下这里给出的技术方法对于福尔马林或多聚甲醛固定组织效果是很好的。其他一些固定剂（如乙醇）也可以采用，但有些固定剂（如 Zenker）效果欠佳。虽然运用这些固定剂的经验还非常有限，但在需要的情况下用这些固定剂固定的组织也是有一定分析价值的。

基本方案　从石蜡包埋组织制备细胞核悬液用于荧光原位杂交（FISH）分析

每个核中杂交信号的数量可通过运用着丝粒 DNA 探针的标准荧光原位杂交（FISH；单元 4.4）方法判定。

材料（标√的条目参见附录 1）

待检石蜡包埋组织（CPMB 单元 14.1）
二甲苯（如 ChemPure、Curtin Matheson）
100%、95%、80%、70%、50%（V/V）乙醇
√胃蛋白酶溶液
√PBS
√2×SSC
丙酮
10～20ng 生物素（biotin）或地高辛（digoxigenin）标记的检染色体的着丝粒探针（单元 4.4）
杂交液：65%（V/V）甲酰胺（如 Oncor）溶于 2×SSC 中（如 Hybrisol Ⅵ，Oncor）
洗脱液：50%（V/V）甲酰胺（如 Oncor）溶于 2×SSC 中，pH7.0（使用前新鲜配制，预热至 39℃）
0.1×SSC，39℃
溶于磷酸缓冲液中的去垢剂（PBD；如 Oncor），室温
带刀片切片机
15ml 锥底玻璃离心管
转筒形转头 Fisher Marathon 21K 离心机或同等设备
37～43℃水浴箱（可摇动最佳）
18G 和 21G 针头的 5ml 注射器
单纤丝尼龙过滤网（105μm；Small Parts）
染缸
22mm×22mm 玻璃盖玻片

乳胶黏合剂

90℃恒温箱

孵育玻片的湿盒（单元 4.4）

配备有适当滤光片和分光器的荧光显微镜（如 Zeiss Axiphot 显微镜，配备有 BP450-490 激发荧光滤光片、FT510 分光器和 SP520 屏蔽滤光片）

注意：探针及杂交液应置于冰上保存以防止反复使用导致荧光信号强度减退。如果探针混合液的制备和用于靶 DNA 之间间隔时间较长，探针混合液亦应置于冰上保存。

1. 用切片机从待检石蜡包埋组织中切下 1～3 片厚 50μm 的切片（对于绝大部分类型的组织，两块 1cm×1cm 大的切片已含有足够数量的细胞核可用于最少 10 个探针的杂交了），置于 15ml 锥底玻璃离心管中。
2. 加入 5ml 二甲苯，放置 5min，并不时用手晃动离心管。室温下 200*g* 离心 5min。吸去上清。
3. 用以下溶液重复第二步操作：

   二甲苯；

   100%乙醇；

   95%乙醇；

   80%乙醇；

   70%乙醇；

   50%乙醇；

   去离子水（两遍）。

   该步骤操作成功的话，将不会再有质硬的白色斑点蜡状的石蜡残留于组织内。如果仅有极少量石蜡碎片残留，用适当工具将其剔出。如果难以剔出石蜡碎片，则标本需按照与以上洗涤顺序相反的顺序再次脱水（开始用水洗最后用二甲苯洗），然后重复去石蜡化及再水化。
4. 加入 1ml 胃蛋白酶溶液消化，37℃摇晃式水浴箱中水浴 30min。
5. 用连接 18G 针头的 5ml 注射器将标本剧烈地上下抽吸吹打数次以打散细胞团块（一些细胞团块将始终存在）。
6. 用单纤丝尼龙过滤网过滤标本，将标本过滤至 15ml 离心管中。
7. 于消化管中再加入 4ml PBS 洗涤并过滤。将管中 PBS 溶液倾倒于过滤网上过滤至第 6 步的离心管中，然后再往过滤网上倾倒 4ml PBS 洗涤滤网，仍将滤液置于同一个离心管内。弃去滤网。
8. 室温下 200*g* 离心 10min。吸去上清。用 2ml PBS 重悬细胞沉淀。用连接 21G 针头的 5ml 注射器将标本剧烈地上下抽吸吹打数次。
9. 室温下 200*g* 离心 10min。吸去上清。用巴氏吸管吸取 PBS 重悬含独立分散细胞核的沉淀并滴片。

   两种不同探针可同时在一张玻片上进行杂交。如果需进行该操作，滴片时玻片两端都应滴上细胞核悬液（图 8.5.1）。
10. 将玻片置于空气中干燥至少 24h。室温下敞开于空气中存放不能超过 1 个月。若需长时间存放，则应于 4℃干燥箱中保存。

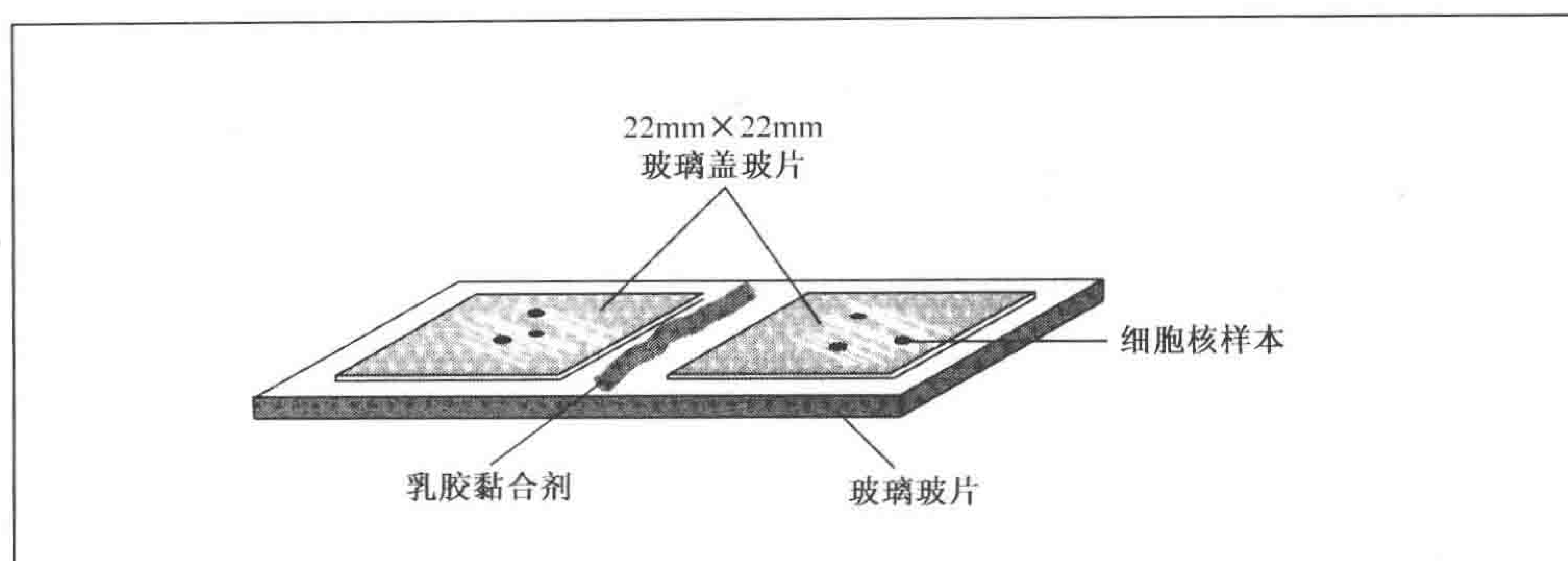


图 8.5.1　一张玻片上同时用两种不同探针进行杂交处理时细胞核悬液于玻片上的位置。

11. 将玻片依次浸入含有下列溶液的 50ml 染缸中脱水，每个染缸内浸泡玻片 2min，溶液均为室温：

    2×SSC；

    70%乙醇；

    80%乙醇；

    95%乙醇；

    100%乙醇；

    丙酮。

    空气中干燥玻片。如需要可于室温下存放数天。

12. 在 15μl 杂交液中加入 1～1.25μl（终浓度为 10ng/μl）生物素或地高辛标记的待检染色体的着丝粒探针（单元 4.4）（针对 22mm×22mm 盖玻片）。

13. 将探针混合液滴于玻片上，盖玻片覆盖于玻片上，排出气泡。在盖玻片边缘用乳胶黏合剂封片。

    如果在一张玻片上同时用两种探针杂交，则先加一种探针，封片（通常为 22mm×22mm 盖玻片）后再加另一种探针以免两种探针混淆（图 8.5.1）。

14. 90℃恒温箱中孵育玻片 5～10min，使探针和靶 DNA 变性。

    如果细胞核由于组织固定或保存中的某些未知原因而变得比较脆弱的话则应减少变性时间至 5min 以内或降低变性温度至 75℃，以最低限度减少杂交信号的丢失或减弱。

15. 将杂交玻片置于湿盒中，于 37℃恒温箱中杂交过夜（12～18h），使探针与靶 DNA 充分杂交。

16. 在含有 39℃洗脱液的 50ml 染缸中洗涤玻片两次，每次 15min（单元 4.4）。洗涤玻片过程中需不断搅动玻片以充分洗涤干净。

17. 将玻片置于含有 39℃的 0.1×SSC 的染缸中，于 39℃摇晃式水浴箱中水浴 30min。

18. 将玻片转至含有室温 PBD 的染缸中，室温下放置 2min，并轻轻搅动玻片。玻片在 4℃下于 PBD 中保存不得超过 2 周，但该步骤中不可将玻片置于空气中干燥。

19. 按照单元 4.4 的操作对染色体进行复染并检测探针信号。

20. 荧光显微镜下观察杂交玻片，记录每个细胞核中原始杂交信号的数量（荧光强度最

强的)，忽略那些荧光信号强度较低的非特异性信号。

备选方案　从石蜡切片中制备细胞核悬液用于荧光原位杂交（FISH）分析

附加材料（标√的条目参见附录1）

10%、20%或30%（m/V）亚硫酸氢钠（Sigma）

25mg/ml蛋白酶K（Sigma；−20℃保存）

√硅烷化玻璃显微镜玻片

65℃恒温箱

1. 用切片机从石蜡包埋组织中切下2～10μm厚的切片，将切片置于硅烷化玻璃显微镜玻片上，使切片漂浮于水中。

   最佳的切片厚度取决于组织的全部细胞构成及胞间基质（如结缔组织），通常针对不同的组织类型应采取不同的切片厚度（某些情况下不同病例的样本亦应有不同处理）。理想情况下切片的厚度应尽量使细胞核的重叠程度最低以使每个细胞核都可以被检测到（细胞核平均直径为5～15μm）。除此之外，在较厚的切片中大量的细胞间基质将更加突出，这将在一定程度上使杂交信号变得模糊不清。

2. 空气中干燥玻片，65℃恒温烤箱烤片过夜使组织黏附于玻片上。
3. 组织切片的脱蜡处理：将玻片放入含有二甲苯的50ml染缸中10min，然后放入含有100%乙醇的染缸中洗涤两遍，每次5min。不时晃动玻片。空气中干燥玻片。若需亚硫酸氢钠处理，则按照第4步操作，如果不需亚硫酸氢钠处理则直接按照第5步进行蛋白酶K处理。
4. 亚硫酸氢钠处理：将玻片放入含有10%、20%或30%（m/V）亚硫酸氢钠溶液的染缸中，43℃水浴箱中水浴10～30min。将玻片置于室温下含有下列溶液的染缸中，按照以下操作进行洗涤和脱水处理：

   2×SSC两遍，每次1min；

   70%乙醇2min；

   80%乙醇2min；

   90%乙醇2min；

   100%乙醇2min。

   空气中干燥玻片。

   亚硫酸氢钠理论上可以通过增加酶与组织的接触而提高蛋白酶K的活性。那些耐消化的组织需要更长的消化时间和高浓度的预处理液进行预处理。该处理的必要性还存在很大争议——但如果杂交信号非常微弱则需进行该步处理。

5. 在40ml 2×SSC中加入400μl的25μg/ml的蛋白酶K，倒入染缸中，水浴中预热至37℃。
6. 将玻片置入蛋白酶K/SSC溶液中，37℃水浴箱中水浴10～40min。
7. 室温下2×SSC洗涤玻片3遍，每次1min。
8. 将玻片依次浸入下列室温下的溶液中进行脱水处理，每次2min：

70%乙醇；
80%乙醇；
95%乙醇；
100%乙醇；
丙酮。

9. 空气中干燥玻片，按照基本方案第12～20步操作进行杂交处理。

参考文献：Schofield and Fletcher，1992

编者：Deborah E. Schofield

单元8.6　羊水细胞用于间期核FISH分析的制备方法

采用经典细胞遗传学方法对羊水细胞做出遗传学诊断需要7～12d时间，而采用间期核FISH方法对间期核进行分析则可在48d内检测出特殊的染色体非整倍体。FISH操作程序中所列出的是间标检测法，但也可采用直接标记DNA探针的直标法。

注意：如果没有特殊要求，所有的培养都必须在37℃、含5%CO_2且湿润的培养箱中进行。

基本方案1　羊水细胞用于间期核FISH分析的非培养制备方法

材料（标√条目参见附录1）

羊水标本，如需保存则应避光室温下存放
最小量必要培养基（MEM；Life Technologies）含左旋谷酰胺、核糖核苷及脱氧核糖核苷，不含血清及抗生素（室温）
√低渗液
0.25%（V/V）Triton X-100（室温下存放）
√PBS
100%乙醇，－20℃
丙酮，冰上保存
固定剂：3∶1（V/V）甲醛/冰乙酸
15ml螺旋管盖锥底离心管
离心机（如IEC Centra-HN）
细胞离心机（如Cytospin Ⅲ；Shandon/Lipshaw）

1. 在一个15ml螺旋管盖锥底离心管中加1～5ml新鲜的羊水。
2. 轻轻地摇晃管子，使里面的细胞悬浮。加入1～2倍体积不含血清的MEM，洗涤细胞，然后室温下200g离心5min。
3. 小心地从离心机上拿出管子，不要碰碎了细胞团块。将上清吸出，留1ml管底的液体，然后使细胞块重新悬浮在剩余的液体中。
4. 加入10ml低渗溶液。混匀，室温培养30min。200g离心5min，然后重复第3步。

用于拥有 Cytospin 细胞离心机的实验室

5a. 用足量的低渗液稀释样品，得到一个最佳的细胞浓度。

如果使用单漏斗，稀释后的最终体积为 0.5ml/片，如果用双漏斗则为 1.0ml/片（第 6a 步）。一般在妊娠 15～17 周获取 2～3ml 羊水可以制作 5 张玻片，每张 75～100 个核型。

这一步非常关键，但是必须通过反复试验来确定最佳的细胞浓度。如果细胞悬液太密，使细胞核和细胞质过分的折叠，减少杂交。悬液太稀导致玻片上的核型不足，分析起来更加麻烦。

6a. 用患者的实验室编号（如名字和登记号）标记载玻片，放在 Cytospin 固定架上。将漏斗放在固定架上，固定。将固定架放在 Cytospin 上。

Cytospin 单漏斗和双漏斗均可使用。使用双漏斗效率更高且成本低，可以将细胞置于同一载玻片的两个不同区域，这样在适当的时候可以使用不同的探针进行杂交。

7a. Cytospin 配置固定架和载玻片后，缓慢、小心地将样品移转至漏斗上，将漏斗内的所有空气置换出来，以确保载玻片-漏斗的接触界面不再有气泡。

8a. 设置 Cytospin 至 1500r/min 离心 4min。仪器停止转动后，从固定架上取出载玻片，空气中干燥。进行第 9 步操作。

用于没有 Cytospin 细胞离心机的实验室

5b. 滴入 1ml 室温保存的固定剂，沿着管壁缓慢滑入，轻轻地进行混合。加入 10ml 室温保存的固定剂，沿着管壁缓慢滑入。盖上盖子，室温培养 15min。

6b. 室温，200g 离心 10min。

7b. 小心地从离心机上拿出管子，不要碰碎了细胞团块。将上清吸出，留 1ml 管底的液体，然后使细胞块重新悬浮在剩余的液体中。

8b. 重复第 5b～7b 步两次，可省略 15min 固定剂中的培养。在小量（通常 0.5ml）固定剂中悬浮细胞块，为制作载玻片获得一个理想的细胞浓度。每个样本准备 1～3 块染色体载玻片（单元 4.1）。进行第 9 步操作。

9. 在一个染色缸中将 100μl 0.25% Triton X-100 和 40ml PBS 进行混合。室温下，将载玻片放在染色缸里摇晃 5min。

10. 将载玻片转移到预冷至－20℃含 100%的乙醇的染色缸中，然后将缸子和载玻片在－20℃冰箱放置 30min（去固定玻片）（在 Triton 和乙醇处理之间没有必要冲洗或晾干玻片）。

11. 在装有冰水预冷的丙酮染色缸中将玻片浸润几秒钟，然后在空气中干燥玻片（为使细胞膜透明）。立即用于 FISH 检测（基本方案 2 和单元 4.4）或在室温中储存至第二天（或在 4℃或－20℃中长期保存）。

备选方案　贴壁羊水细胞间期核 FISH 分析的制作

因为有时候要用到盖玻片上的贴壁细胞，另外一些情况下要求初级培养，所以这个

方案出报告的时间比基本方案 1 更长一些。

注意：在应用此方案进行后续的 FISH 分析时，最初可能要求细胞黏附在载玻片或者盖玻片上。为了简化，在此方案中只提及盖玻片。

附加材料（基本方案 1）

加有 1%（*V*/*V*）青霉素/链霉素（10 000U/ml 青霉素/10 000μg/ml 链霉素；Bio-Whittaker）的原位杂交培养基（Irvine Scientific）或 Amniomax 完全培养基（Life Technologies）

1. 按照单元 8.2 的基本方案第 1～8 步准备用来培养的羊水，在放置培养皿/盖玻片时，使用配制好的原位杂交培养基或 Amniomax 完全培养基。
2. 将带有盖玻片的组织培养皿放在培养箱中。静置培养 24h，使细胞牢固地黏附在盖玻片上。
3. 培养 24h 后，再轻轻地加 1.5ml 相同的培养基（配制好的原位杂交培养基或 Amniomax 完全培养基），培养基在培养时就要准备好，继续培养。
4. 在继续培养 24～48h 后，小心地将皿从培养箱中取出。轻轻地将培养基倒掉，无需使用 tip，再沿着皿壁加 2ml 室温的低渗液。室温静置 20min。
5. 在低渗液中沿着皿壁轻轻地一滴一滴地加 2ml 室温的固定剂。室温静置 5min，然后轻轻地将溶液抽吸出来。
6. 跟第 5 步一样，轻轻地加 2ml 新鲜的固定剂。室温静置 5min，然后轻轻地将溶液抽吸出来。重复这一步操作两次或两次以上。
7. 在第一个培养皿中轻轻地加 2ml 新鲜的固定剂，盖上盖。同样处理其他皿。
8. 根据单元 8.2 基本方案第 19～21 步，晾干盖玻片。立即用于 FISH 分析（单元 4.4）或者在室温中保存，直到第二天使用（可于 4℃或－20℃中保存更长）。

基本方案 2　羊水细胞间期核细胞分析

材料（标√条目参见附录 1）

附有羊水细胞的载玻片或盖玻片（基本方案 1 或备选方案）

2×SSC，37℃

70%、80%和 100%（*V*/*V*）乙醇，用冰预冷

√变性溶液，70℃

生物素或地高辛标记 DNA 探针（单元 4.4）：10ng/μl α 卫星探针（如针对 18 号染色体的 D18Z1；Oncor 或 Vysis）或 10～100ng/μl 预先包装好的单一序列探针（封闭 DNA 和杂交溶液预先混合；Oncor 或 Cambic）

√杂交溶液

√65%甲酰胺洗涤液

√50%甲酰胺洗涤液

√PN 缓冲液

√荧光素标记的抗生物素蛋白

√5μg/ml 生物素化的抗生物素蛋白抗体操作溶液
√DAPI 染色液
  2μg/ml 二碘化丙锭
√苯二胺氟安定抗退色封固剂（抗退色封固剂配方）
  37℃载物片加温器
  43℃、70℃和 72℃水浴箱
  24mm×50mm 塑料的和 24mm×60mm 玻璃盖玻片
  胶布
  保湿室（单元 4.4）
  荧光落射显微镜和用来设置恰当荧光的滤光片

1. 于 37℃水浴箱，在盛有 2×SSC 溶液的染色缸里，将附有羊水细胞的载玻片或盖玻片摇动 1h。
2. 在盛有 70%、冰水预冷的乙醇染色缸中漂洗玻片 2min。每块玻片继续在 80%和 100%冷乙醇中脱水 2min。让玻片于室温空气中自然干燥。
3. 于 72℃水浴箱，在盛有刚好 70℃变性溶液的染色缸中准确地摇动 2min（加一块玻片后，就将水浴箱温度升高 1℃）。

   这一步是成功的关键。

4. 重复第 2 步。将变性后的玻片在载物片加温器中预热至 37℃，直至杂交。

用于 α-卫星重复 DNA 探针

5a. 于 37℃水浴箱，在 1.5ml 微量离心管中预热 10ng/μl α-卫星 DNA 探针和杂交溶液 5min。

   这一步所用的重复 DNA 探针通过商业途径获得。在这一过程中为了特别的需要而进行一些探针的修饰提到了产物数据表。实验室关于不同的探针应用和探针的标记方案参见单元 4.4 中的详细介绍。

6a. 每块玻片在杂交时，在一个新的微量离心管中混合 1.5μl 预热的探针和 30μl 预热的杂交溶液。

7a. 在一个 70℃水浴箱中孵化探针/杂交溶液混合液 5min，使探针变性。迅速在冰上冷却至 4℃。稍微地旋动一下，然后以最大转速离心 2～3s。

8a. 用 31.5μl 探针/杂交溶液混合液（15ng DNA）使在第 4 步中制作的每块玻片上的染色体变性。用 24mm×50mm 的塑料盖玻片盖住混合液，用较轻的压力将气泡赶走。用胶带密封。于保湿室 37℃过夜（14～18h）孵化（单元 4.4）。

   尽管这一过程称为过夜孵化，但在利用 α 卫星重复 DNA 探针时，杂交的时间可缩至 2～4h。

9a. 于 43℃水浴箱中，在盛有 65%甲酰胺洗涤液的染色缸内，断断续续洗涤玻片 15min。进入第 10 步。

用于预先包装好的单一序列探针

5b. 取 10μl 10～100ng/μl 包装探针至 1.5ml 微量离心管内，用于与每块玻片杂交。

商业化的单一序列探针成套的预先与封闭的（Cot-1）DNA 和 50％甲酰胺杂交溶液进行了混合。许多商业化的单一序列探针（Oncor）不要求变性。

6b. 在一个 37℃水浴箱中，孵化包装探针 5min。

在这一过程中为了特别的需要而进行一些探针的修饰提到了产物数据表。实验室关于不同的探针应用和探针的标记方案见单元 4.4 中的详细介绍。

7b. 用 10μl 包装探针（100～1000ng DNA）使第 4 步每块玻片上制作的染色体变性。

8b. 用 24mm×50mm 的塑料盖玻片盖住混合液，用较轻的压力将气泡赶走。用胶带密封。于保湿室 37℃过夜（14～18h；第 8a 步中的注释）孵化。

9b. 于 43℃水浴箱中，在盛有 50％甲酰胺洗涤液的染色缸内，断断续续洗涤玻片 15min。进入第 10 步。

10. 37℃水浴，在盛有 2×SSC 的染色缸内，间断地洗涤玻片 8min。

11. 室温下在盛有 PN 缓冲液的染色缸中简单地冲洗玻片。从染色缸中取出玻片，弄掉过多的液体但不要让玻片干掉。

12a. 生物素标记探针：用 60μl 卵白素去杂交每块玻片上的染色体标本。放置一块 24mm×50mm 的塑料盖玻片盖住溶液，用较轻的压力将气泡赶走。于 37℃保湿室孵化 20min。

12b. 地高辛标记探针：用 60μl 荧光素结合羊抗地高辛 Fab 片段去杂交每块玻片上的染色体标本。放置一块 24mm×50mm 的塑料盖玻片盖住溶液，用较轻的压力将气泡赶走。于 37℃保湿室孵化 20min。

13. 依次在三个独立的盛有 PN 缓冲液的染缸中间断地洗涤玻片 2min。

14a. 扩大生物素标记探针信号（如果需要）：用 60μl 5μl/μg 的生物素化的抗生物素蛋白抗体去杂交每块玻片上的染色体标本。放置一块 24mm×50mm 的塑料盖玻片盖住溶液，用较轻的压力将气泡赶走。于 37℃保湿室孵化 20min。重复第 13、12a 和 13 步。

14b. 扩大地高辛标记探针信号（如果需要）：用 60μl 5μl/ml 带有荧光素标记抗兔抗体的兔抗羊抗体，根据需要在步骤之间进行洗涤。

一些情况下可以获得弱信号，可能需要进行第二轮信号扩大，这些片子需要重复第 14 步的操作。

15. 用 21μl 2μg/ml 的 DAPI 染色液和 21μl 2μg/ml 的碘化丙锭去杂交每块玻片上的染色体标本。在暗室中室温孵化 5min。

DAPI 能提供最佳的细胞形态，而在中期分裂相碘化丙锭能提供一个一致的红色背景，从而便于观察黄-绿色荧光信号。

16. 在一个盛有 PN 缓冲液的染色缸中冲洗玻片 3min，去除过剩的染液。

17. 用 21μl 苯二胺氟安定抗退色封固剂去杂交每块玻片上的染色体标本。用一个 24mm×60mm 的玻璃盖玻片盖住。

18. 用荧光显微镜检查玻片，对能提供有意义结果的细胞照相。对每个所使用的探针每 50 个细胞计数杂交信号的数量，来分析中期核细胞。

参考文献：ACMG，1993；Klinger *et al.*，1992

编者：Stuart Schwartz，Mark A. Micale，and Laurie Becher

单元 8.7　范可尼贫血(先天性骨髓发育不全)的诊断——二氧桥丁烷（双环氧丁烷）检测

范可尼贫血（fanconi anemia，FA）是一种常染色体隐性综合征，其临床特征表现为进行性骨髓衰竭和恶性肿瘤的患病风险增加，尤其是急性骨髓性白血病和鳞状上皮细胞癌。

尽管 FA 的病理生理机制仍不清楚，由于对 DNA 交联物质的诱变效应高度敏感，提供了诊断 FA 的唯一标志。利用这种分子特征可以为贫血前期患者和有贫血症状的患者，以及有或无 FA 典型症状的白血病患者提供一个诊断性的检测。许多化学物质也可以用来检测 DNA 交联敏感性。二氧桥丁烷（DEB；1，3-双环氧丁烷）检验是诊断 FA 的首选方法，因为它的敏感性和特异性最高，而其他检测方法则会产生较高的假阳性和假阴性结果。

提醒： DEB 是一种潜在的致癌物质，在处理此化合物时必须小心谨慎（支持方案 1）。

注意： 所有用来接触活细胞的试剂和仪器必须是无菌的。除非其他需要，培养要求在一个湿润、37℃、含有 5% CO_2 的培育箱中完成。

基本方案　出生后范可尼贫血二氧桥丁烷诊断试验

在用 DEB 作为 FA 的实验室诊断时，最好的组织是外周血。在 0.1μg/ml 时，DEB 可诱导 FA 细胞多条染色体断裂和交换，但对来源于非 FA 的人的细胞却很少有诱变效应。

材料（标√条目参见附录 1）

外周血：收集在一个带有肝素钠的可以自由保存的 Vacutainer 管中（如 Fisher 管）

RPMI/15% FBS 完全培养基（附录 1）/1%（*m*/*V*）植物血细胞凝集素（phytohemagglutinin）（PHA；Burroughs Wellcome）

√PBS

二氧桥丁烷（1，3-双环氧丁烷，DEB；Aldrich；保存在 4℃）

1μg/ml 秋水仙胺（如 Lefe Technologies；保存在 4℃）

0.075mol/L KCl，37℃

固定剂：3∶1（*V*/*V*）甲醇/冰乙酸，现配现用

配有 18 1/2G 针头的 10ml 注射器

25cm² 组织培养瓶

15ml 的带盖无菌圆锥形底离心管

IEC 临床用离心机或类似的仪器

显微镜用的载玻片（保存在 70%乙醇中）

倒置显微镜

1. 从配有18 1/2G针头的10ml注射器中滴入外周血（18～25滴；0.4～0.5ml）至已盛有10ml RPMI/15% FBS完全培养基的$25cm^2$组织培养瓶中。配置两份培养基为DEB研究，两份作为未处理对照（共4份）。孵化培养基24h（附录3I）。
2. 分装PBS至3个15ml离心管中：第1管10ml，第2管6ml，第3管4.5ml。
3. 在加培养基之前，先加10μl常用的DEB至第1管，加盖，混匀。从第1管中转移4ml至第2管，加盖，混匀。从第2管中转移0.5ml（500μl）至第3管，加盖，混匀。
4. 从第3管中各取25μl溶液加入两个已孵化了24h的外周血培养基中（从第1步；培养瓶中的最终浓度为0.1μg/ml。）。再孵化48～72h。
5. 每10ml培养基中各加入1μl/ml的秋水仙胺2ml，孵化20min。
6. 将每个培养基培养瓶中的液体转移到15ml圆锥形底部的离心管中，加盖，150*g*离心10min。
7. 去掉大部分上清液，用手指轻弹离心管，使剩余上清中的片状沉淀物重新处于悬浮状态，小心地加入预热的0.075mol/L KCl 5ml，使细胞膨胀，但不要使其破裂。在37℃水浴槽中孵化10min。室温，150*g*离心10min。
8. 去掉上清，轻轻地加入1ml新鲜的固定剂，不要把沉淀冲起来。去掉固定剂，重复这一步。
9. 立即用食指弹击管壁几次，使片状沉淀物碎裂。迅速加入固定剂使细胞悬浮，防止其成块。终体积为8～10ml。用Pasteur移液管打散团块。室温静置30min。
10. 室温，150*g*离心10min。去掉上清，留下3～5ml，使片状沉淀物悬浮。室温静置10min。可立即重复这一步一次或两次，也可以让固定剂中的细胞在室温下过夜以后进行。
11. 室温，150*g*离心10min。去掉上清，打散沉淀，加入适量的固定剂（0.25～0.5ml），使其达到一个理想的浓度用于制片。

    一个理想的细胞浓度能使绝大部分细胞在一个显微视野中，没有拥挤的中期伸展。

12. 从一个适当的高度，滴下几滴细胞悬液于清洁的玻片上，使中期分裂相能很好地散布（单元4.1），一瓶培养基最少要制作6块玻片（推荐使用非诊断用的细胞去练习）。

    这一步是成功的关键。

13. 在倒置显微镜下观测玻片，确定中期分裂相的质量和数量。用吉姆萨将玻片染色（支持方案2）。
14. 每一个DEB处理的标本分析50～100个用吉姆萨染色的中期分裂相（对于高度断裂的情况分析25个中期分裂相；附录3K）。对染色体进行计数，并记录结构异常的染色体的数目和类型。如果断裂的染色体超过了上面的正常范围，分析未处理的

标本。分析完成后对异常的细胞进行照相。

15. 根据已出版的结果作为基础和 PHA 刺激下，外周血淋巴细胞中 DEB 诱导染色体断裂情况下解释结果。

表 8.7.1 显示了从正常和受影响的个体中得到的基线和处理培养数据

表 8.7.1　外周血淋巴细胞和培养的胚胎细胞中染色体断裂的范围

组织	诊断	平均值断裂/细胞		无个体测试
		基线	DEB-treated[a]	
外周血	FA	0.02～0.85[b]	1.10～23.9	98
	Non-FA	0.00～0.12	0.00～0.36	124
成纤维细胞	FA	0.20～0.36	0.68～1.10	3
	Non-FA	0.00～0.08	0.00～0.07	4
羊水细胞	FA	0.18～0.45	0.69～0.96	10[c]
	Non-FA	0.00～0.12	0.00～0.14	48[c]
绒毛膜绒毛	FA	0.30～0.46	1.00～1.40	9[c]
	Non-FA	0.00～0.10	0.00～0.14	39[c]

a. 外周血培养 DEB 浓度为 0.1μg/ml、纤维细胞、羊水和绒毛膜绒毛培养浓度为 0.01μg/ml；

b. 数据显示每个细胞断裂的平均组；

c. 怀孕过有问题小孩的夫妇进行孕前诊断的数目（A. D. A.，unpub. observ.）。

支持方案 1　二氧桥丁烷的使用和处理

DEB（1，3-双环氧丁烷）为潜在的致癌物质，处理这种化合物时，必须采取一些防范措施。这一部分阐述的是如何使用和恰当地处理废物。

工作空间。凡用到 DEB 的操作必须在化学通风橱或者Ⅱ级生物学安全工作橱中完成。在使用 DEB 时要穿实验工作服和戴手套。手上随时准备一瓶 6mol/L HCl (50ml)，一旦 DEB 不小心倒出来马上将其灭活。

细胞培养。有 DEB 参与的细胞培养操作应该在Ⅱ级生物学安全工作橱中完成。细胞被固定后，操作就可以在安全橱外进行了。用 6mol/L HCl 处理废弃的培养基和清洗液，并视其为危险生物废物。以前使用过的移液管和培养瓶应该用 6mol/L HCl 冲洗，并放在高压危险生物袋中。微量移液吸头也应该丢在盛有 6mol/L HCl 的小瓶内。

废物处理。DEB 原液应该当作危险的化学废物来处理，而不能采用稀释或化学灭活的方法。使用过的塑料器具应该用 6mol/L HCl 冲洗并丢入高压危险生物袋中。培养基和清洗液也应该用 6mol/L HCl 处理，并作为危险生物废物来处置。

支持方案 2　用于染色体断裂分析的吉姆萨染色

吉姆萨染色是一种组织学染色，对细胞核和染色体有特别的亲和力。制作简单，使未显带的细胞核和染色体成微红色到紫色。

材料

Gurrs 缓冲液，pH6.8，数片（生物学/医学专用）

吉姆萨染液（如 Life Technologies）

中期染色体玻片（基本方案）

Permount 组织封固剂

染色缸

1. 将一片 pH6.8 的 Gurrs 缓冲液溶于 1L 水中。
2. 加入 4ml 新鲜的吉姆萨染液至盛有 46ml Gurrs 缓冲液的染缸中。染液可使用 1h 或染 20 块玻片，然后就要配置新的染液。
3. 将中期染色体玻片染色 5min。在盛有 Gurrs 缓冲液的染缸中浸洗几次（第 1 步）。
4. 在盛有水的染缸中浸洗几次。空气中干燥，检查玻片的染色强度。

   染色强度应该足量，而染色体上的裂痕和断裂区又不易染色（非染色）。

5. 使用 Permount 组织封固剂将盖玻片加载于载玻片上。

备选方案 1　成纤维细胞培养二氧桥丁烷试验

如果外周血不能获取，可以通过皮肤组织活检成纤维细胞培养来进行试验。也可以从流产儿或死产儿中取几小片肺组织或皮肤来进行试验。因为较高浓度对 FA 成纤维细胞有太大的毒性，很难收获足够多的中期分裂相来进行研究。

附加材料（基本方案；标√条目参见附录 1）

活体组织（如取 3mm 深足够厚的皮肤样本）

√DMEM 完全培养基/20% FBS

0.051mol/L（0.38% *m/V*）KCl

60mm 组织培养皿

处理过的手术刀

1. 将 0.5ml DMEM 完全培养基/20% FBS 溶液中的活体组织放于一块 60mm 组织培养皿上，并用无菌手术刀将其切割成片，1mm 大小。
2. 另取最少三块 60mm 组织培养皿，用无菌手术刀尖在皿底划上几条水平线和垂直线。滴几滴 DMEM 完全培养基/20% FBS 溶液至活体组织片上。在每个 60mm 组织培养皿上用无菌 Pasteur 移液管放上 5 或 6 片活体组织。将组织放在水平线和垂直线的交叉点上。
3. 孵化培养皿，不要加任何其他组织培养基，15～30min，使组织片黏附在皿上。加 5ml DMEM 完全培养基/20% FBS 溶液至每块培养皿中，孵化培养基。
4. 每 3～4d 更换一次培养基，但不要扰乱组织片。使用倒置显微镜观察培养基中细胞的生长状况（得花上 1 周至 1 月才能观察到生长较好的细胞）。
5. 当培养皿中的组织片周围能看到大片的成纤维细胞时，用 1×胰岛素/EDTA/15% FBS 处理细胞，进行传代（附录 3I），注意当活体组织能够继续在培养基中生长时不要将它们取出来。将细胞转移至盛有 DMEM 完全培养基/15%FBS 的 25cm² 无菌组织培养瓶内。
6. 当第一代细胞长满后，再次用胰蛋白酶处理（附录 3I）。次代培养按 1∶3 分装至 DMEM 完全培养基/15% FBS 溶液中。为 FA 患者进行 DEB 试验时，至少有两个第二代培养基中长满细胞。

7. 用 5ml DMEM 完全培养基/15% FBS 溶液将细胞接种在 $25cm^2$ 培养瓶中，使每个培养瓶中细胞的密度达到 3×10^5 个细胞（为本次检验准备两个处理的和未处理的对照培养瓶）。孵化 24h。
8. 将 DEB 按以前所描述的那样稀释（基本方案，第 2～3 步），再增加第 4 管，分装 PBS 4.5ml。成纤维细胞培养还要增加最后一步稀释，即从第 3 管中取出 0.5ml (500μl) 加入第 4 管中。
9. 从第 4 管取出 25μl 加入到 10ml 新鲜的 DMEM 完全培养基/15% FBS 溶液中。
10. 培养细胞直至细胞接近长满（约 72h）。
11. 胰酶消化细胞（附录 3I）按 1∶2 或 1∶3 传代到新鲜的完全 DMEM/15% FBS 培养基。该培养基不含 DEB 用于收集充足的有丝分裂细胞来进行细胞遗传研究。重新加入限制性培养基，该培养基含有鲜好、稀释的 DEB。
12. 于第一个有丝分裂时段收集培养的细胞（传代 24～48h；这时细胞处于有丝分裂中期附近），在收集细胞前 3h，加入 1ml 浓度为 1μg/ml 的秋水仙胺到 DEB 处理的细胞中，同时用未用 DEB 处理的细胞作对照（于 5ml 培养基）。
13. 用胰酶消化细胞，将培养瓶内的液体转移至 15ml 无菌的离心管，加盖，150*g* 离心 10min。
14. 去掉大部分上清，使剩余上清内的沉淀重新悬浮，并慢慢加入 0.051mol/L 的 KCl 5ml。在 37℃水浴箱中孵化 10min。离心 10min。
15. 像前面叙述的那样将细胞固定在预备好的载玻片上（基本方案，第 9～12 步；在第 9 步，缓慢加入 3～5ml 固定液）。
16. 检验 100 个未处理和 DEB 处理后吉姆萨染色的中期分裂相细胞，找断裂染色体，方法如前所述（基本方案，第 13 步，支持方案 2）。根据在 FA 患者成纤维细胞中为基线和 DEB 诱导的染色体断裂所建立的评估来解释结果。

备选方案 2　范可尼贫血二氧桥丁烷产前诊断试验

FA 可以在妊娠时诊断，但有一定风险，在怀孕 9～12 周时通过培养绒毛绒膜取样 (chorionic villus sampling，CVS) 获得滋养层细胞或者在 15～17 周时羊膜穿刺获得羊水细胞进行研究。FA 也可以用胎儿血液进行产前诊断，方法与以前的外周血培养相同。

研究 CVS 或羊膜穿刺获得的胎儿细胞

附加材料

胎儿细胞，足够于在两个 $25cm^2$ 的培养瓶中进行培养

生长培养基：Chang 培养基和 RPMI 完全培养基/15% FBS 以 1∶1 混合（附录 I 中个人配方）

1. 在 $25cm^2$ 的培养瓶内配置胎儿细胞培养基（单元 8.1 和单元 8.2）。
2. 当培养瓶内有几个大的、生长迅速的克隆时，不要让克隆过度的生长，用胰酶消化细胞，按 1∶2 或 1∶3 进行首次传代培养（附录 3I）。孵化 24h。

3. 用含有 0.01μg/ml DEB 的新鲜生长培养基置换生长培养基（从两个不同的首次传代培养基中）至最少两个培养瓶中。可能的话，用含 0.1μg/ml DEB 的培养基置换首次传代的培养基至另外两个培养瓶中，稀释与以前相同（备选方案 1，第 8～9 步）。

   剩余培养瓶中的液体作为染色体断裂研究基线的未处理对照。

4. 孵化培养基，收获并固定细胞，如之前叙述的那样准备中期染色体涂片（备选方案 1，从第 10 步开始）。
5. 每组共检测 100 个中期分裂相（基线组，DEB 处理组；每组分别从两个首次传代培养瓶中各取 50 个中期分裂相）。根据针对通过 CVS 或羊膜穿刺获得的 FA 胎儿细胞所制定的基线和 DEB 诱导的染色体断裂所建立起来的评估来解释结果。

胎血细胞研究

附加材料

肝素抗凝的胎血

√ RPMI 完全培养基/15% FBS

1. 加 0.25ml 肝素抗凝的胎血（收集在一个带有肝素钠可以自由保存的 Vacutainer 管中；如 Fisher 管）至一个盛有 10ml RPMI 完全培养基/15% FBS 的 $25cm^2$ 培养瓶中。为基线组和 DEB 处理组配置 2～4 瓶培养基，根据所收集胎血的多少而定。
2. 孵化、处理、收获、检测胎血培养基细胞，方法同前（基本方案，第 2～15 步）。

参考文献：Auerbach，A. D. 1993；Auerbach *et al.*，1989

编者：Arleen D. Auerbach

第9章　临床分子遗传学

人类遗传学研究主要是确定人类疾病相关基因和描述各类突变。这为阐述遗传性疾病的病理生理机制以及建立一些新的诊断方法提供了线索。分子诊断包括 DNA 和 RNA 样品的致病性突变检测。分子诊断可以提供非常精确的诊断，有时还可以预测疾病的临床发病过程。也避免了进行组织活检的必要，因为任何组织的 DNA 都可用来检测，如外周血或口腔的衬细胞。另外，还可以通过对绒毛膜绒毛活组织和羊水细胞的 DNA 检测来进行产前诊断。

定向突变检测的方法因不同的疾病而有所差别。这章的目的不是讲述当前使用的所有检测方法，而是列出了一些具体的检测模式，使用适当的 DNA 探针或 PCR 引物，通常也可以运用于其他的疾病。例如，基于多重 PCR，对患有 Duchenne/Becker（单元 9.1）型肌营养不良的男性患者进行营养不良基因缺失型突变检测，此方法一般也可以运用于其他 X 连锁的疾病，缺失是突变发生的共同机制。另一种多重 PCR 检测方法（单元 9.2）已被用来确定纤维囊泡症的点突变，但对一般带有点突变的任何疾病也是可以应用的。单元 9.7 列出了另一种检测点突变的方法，这一方法基于使用特异地扩增突变或野生型等位基因的 PCR 引物。这一方法也将广泛地运用于对临床患者进行高效的已知突变检测。沿着同样的思路，单元 9.11 列出了载脂蛋白 E 基因（apolipoprotein E gene；*ApoE*）单核苷酸多态分析的方案。

近来有几种疾病得到了确认，其基因突变的基础是三核苷酸重复而导致的基因大小的变化。检测这样的突变，包括脆性 X 综合征，在单元 9.3 中进行了讲述。单元 9.4 讲述了另一种三核苷酸重复疾病（肌强直性营养不良）的检测方法。

因线粒体基因突变会导致能量代谢方面的疾病，近几年，分子检测也应用到了线粒体基因组。线粒体突变检测方案见单元 9.8。

PCR 技术和体外授精技术的发展使得人们能够对从胚泡期早期胚胎中分离出来的单个细胞进行某些基因的突变检测（单元 9.9）。单元 9.10 讲述了蛋白质截短实验，是检测翻译提前终止突变的一种方法。这里提到了一种寻找突变的一般方法，这对检测巨大基因的各种不同的突变特别有用，因为大部分突变会导致蛋白质截短。

分子遗传学试验也越来越多地应用在身份鉴定中。在这一章中增加了一单元来阐述亲子鉴定（单元 9.6）。在分子水平，现在也可以确定雌性个体的哪条 X 染色体是失活的（单元 9.5）。

由于对人类基因组的认识不断增加，分子诊断领域正在快速的发展。新的诊断试验持续发展，对诊断实验室和追赶潮流的创业医生带来了巨大的挑战。互联网能提供详细的路径去获取遗传性疾病和遗传检测的信息，而计算机数据库发挥着越来越重要的作用。

编者：Bruce R. Korf

单元 9.1　运用多重 PCR 检测营养不良基因缺失

本单元所讲的是用来诊断营养不良基因缺失的一种多重 PCR 方法（图 9.1.1）。许多缺失末端能被确定，依据翻译可读框的结果来预测疾病（如 DMD 与 BMD）的严重程度（图 9.1.2）。

注意： 涉及 PCR 的实验操作要求非常小心，以防污染。

基本方案　检测营养不良基因缺失的诊断性多重 PCR

材料（标√条目参见附录 1）

反应混合物 A、B 和 C（支持方案）

5U/μl *Taq* DNA 聚合酶（如 Perkin-Elmer Cetus AmpliTaq 或 Native Taq）

50ng/μl 保存在 TE 缓冲液中的 DNA 模板（pH 8.0；附录 1），模板可从细胞株、血液、保存的组织（附录 3A）、绒毛膜绒毛活组织检查、羊水或其他标本中获得

石蜡油

1.5%（*m/V*）含 0.5μg/ml 溴化乙锭的微型琼脂糖胶

√电泳缓冲液（TAE 或 TBE）

√10×胶用载样缓冲液

专用配置反应体系的微量吸管

两部热循环仪，预热至 94℃

常用检测反应产物的微量吸管

1. 在冰上融化这三种反应混合物（A、B 和 C），根据需要扩增的检测样本数（每 50μl 的反应体系需要 44.5μl 的反应混合物）来计算每种混合物的量。计算足够量的另外用于平行阳性（来自男性完整的营养不良基因）和阴性（未加模板）对照的反应物 2.5μl，以及另外 0.5μl 补偿取样时样品的丢失量。
2. 分装适量的各种混合物至标有 A、B 和 C 的 1.5ml 微量离心管中，冰上操作。加 0.5μl 每反应体系 5U/μl 的 *Taq* DNA 聚合酶至离心管中。用移液管充分混匀，离心 5～10s，将管壁上的液体离心至管底。
3. 将要进行循环的反应管在相应的管盖上标记。将管子放于冰上，每管分装 45μl 准备好的反应混合物。
4. 每管加入 5μl 50ng/μl 的 DNA 模板。最后阴性对照管中加入 5μl 无菌水。

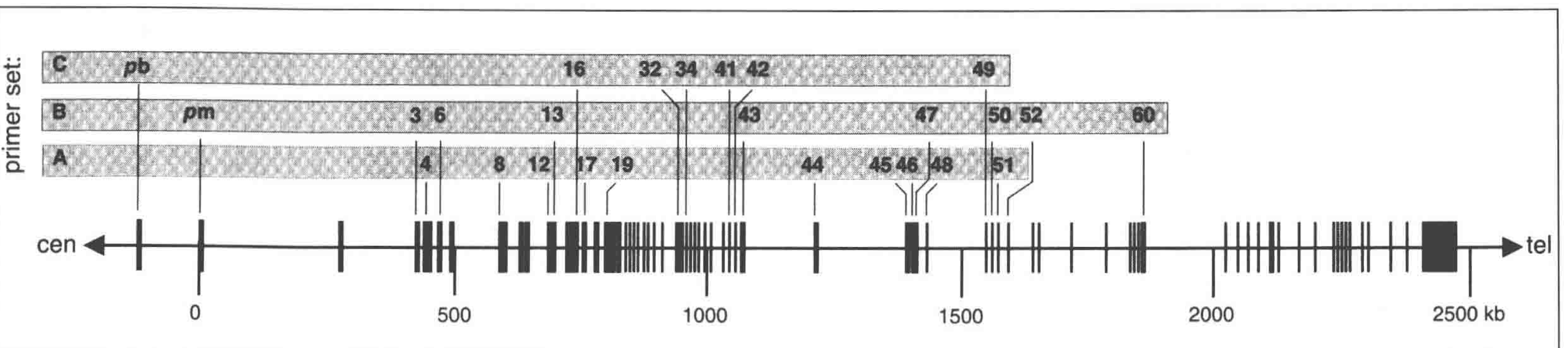


图 9.1.1 营养不良基因表格图展示了用 A、B 和 C(包含在灰色条带内) 三个标准诊断试验扩增的外显子的相关位置。垂直线指根据 Coffey 等 (1992) 确定的外显子的大概位置； 细线所指的是近似的位置。缩写： *pb*, 脑组织特异性启动子 (Boyce *et al.*, 1991)；*pm*, 肌组织特异性启动子； cen, 基因靠着丝粒端； tel, 基因的末端。

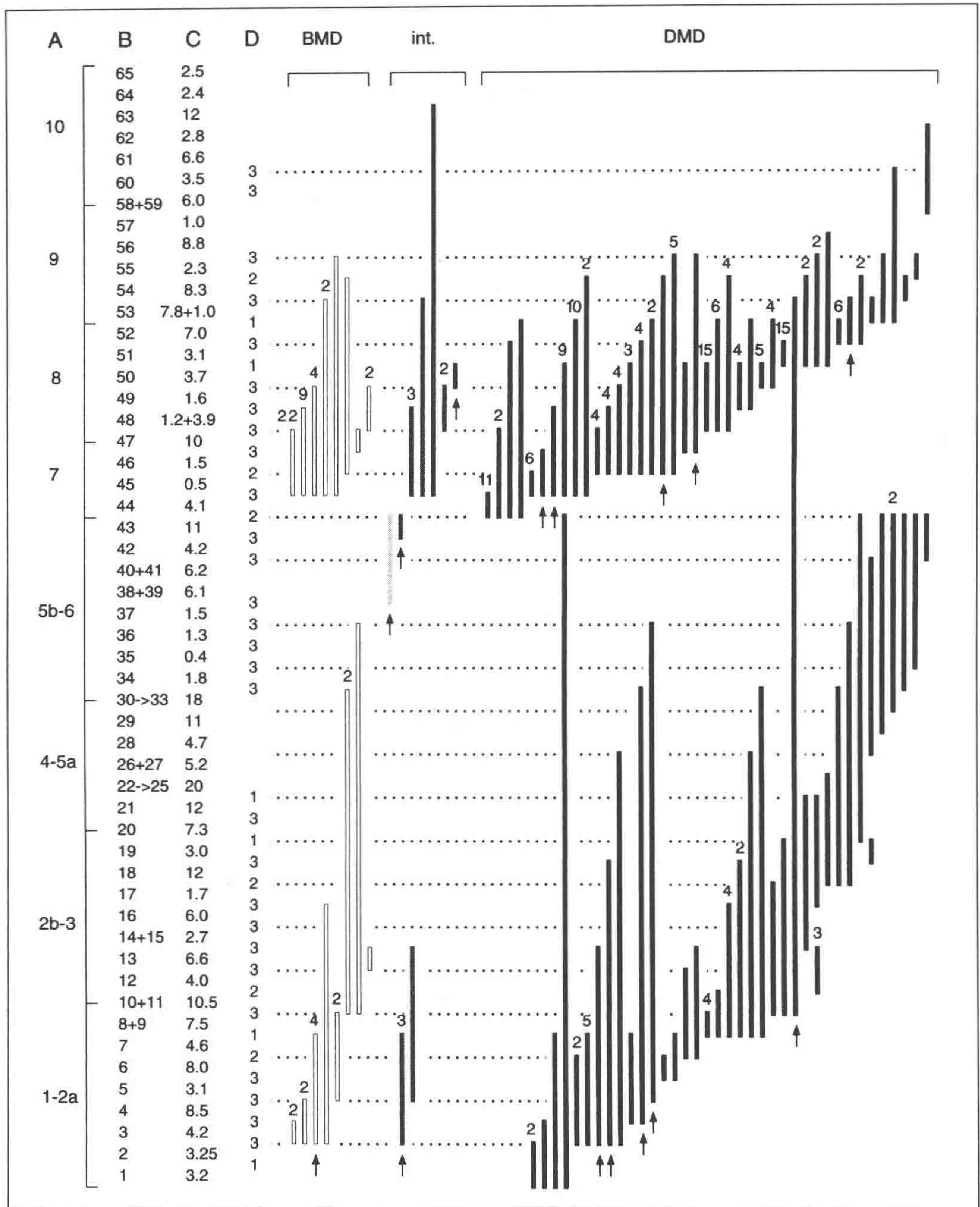


图 9.1.2　有 DMD 和 BMD 临床表型的患者所对应的营养不良基因缺失情况（和它们翻译的可读框产生的效应）。直线条代表在 273 个不相干的 DMD/BMD 病例中缺失的范围。A. 用来检测缺失的营养不良基因 cDNA 探针（因为在 11～14 号探针检测到缺失，所以没有列出这些探针）；B. 外显子数目；C. 外显子包含的 *Hind*Ⅲ片段（大小为 kb）；D. 外显子边缘类型。线条指示的是前面所提到的相应表型的缺失范围。“int”代表相对于典型 DMD 临床症状较轻的年轻患者和 13～15 岁需要坐轮椅的中期患者。线条上方的数字代表相同缺失类型的病例数（如果>1）。箭头表示的是不遵循基因型与表型相关的可读框规则的缺失。

5. 如果所使用的循环仪没有热盖，每管中加入一滴（25～50μl）石蜡油，然后盖紧盖子。滴石蜡油时避免管内的液体飞溅到其他管子中。高速离心 5～10s，将所有液态的反应成分离心至石蜡油层的下面，确保石蜡油完全覆盖反应混合物的表面。
6. 预热一部循环仪至 94℃，放上含有反应混合物 A 的管子，依照下列条件扩增。

起始步：	6min	94℃	（变性）
25 个循环：	30s	94℃	（变性）
	30s	53℃	（退火）
	4min	65℃	（延伸）
最后一步：	7min	65℃	（延伸）

检测前于 4℃保存。
7. 预热另一部循环仪至 94℃ ，依照以下条件扩增所有混合反应物 B 和 C。

起始步：	6min	94℃	（变性）
25 个循环：	30s	94℃	（变性）
	4min	65℃	（延伸和变性）
最后一步：	7min	65℃	（延伸）

检测前于 4℃保存。
8. 准备 1.5%、含 0.5μg/ml 溴化乙锭的琼脂糖微型胶（胶的体积为 25ml），以及同样浓度的溴化乙锭电泳缓冲液。
9. 在同面胶上电泳每对引物的所有产物，便于直接将阳性和阴性对照与患者的样本进行比较。在胶上点样前，首先在一张石蜡膜上点上 2μl 大小的 10×载样缓冲液（一面胶的载样缓冲液要足量，以防点样时蒸发）。将移液管 tip 插入油层下面的液态反应产物中，吸取 15μl PCR 产物，tip 在经过油层时要将空气中的气泡排掉。用纸擦掉 tip 上多余的石蜡油，将反应产物与载样缓冲液在石蜡膜上混合。
10. 以 2V/cm 将微型胶电泳 15min，然后 5V/cm 电泳 90min，直到溴酚蓝与胶底边相差 1cm。照相，记录结果。照相时要仔细检查每面胶，确保所有条带能准确地照下来。
11. 于 4℃保存剩余的产物，直到胶图照相完成和结果得到解释为止。如果胶检测出现了问题，在扩增几星期后还可再将样品进行电泳检测。
12. 记录，并且根据图 9.1.3 示范的标准形式解释 PCR 结果。

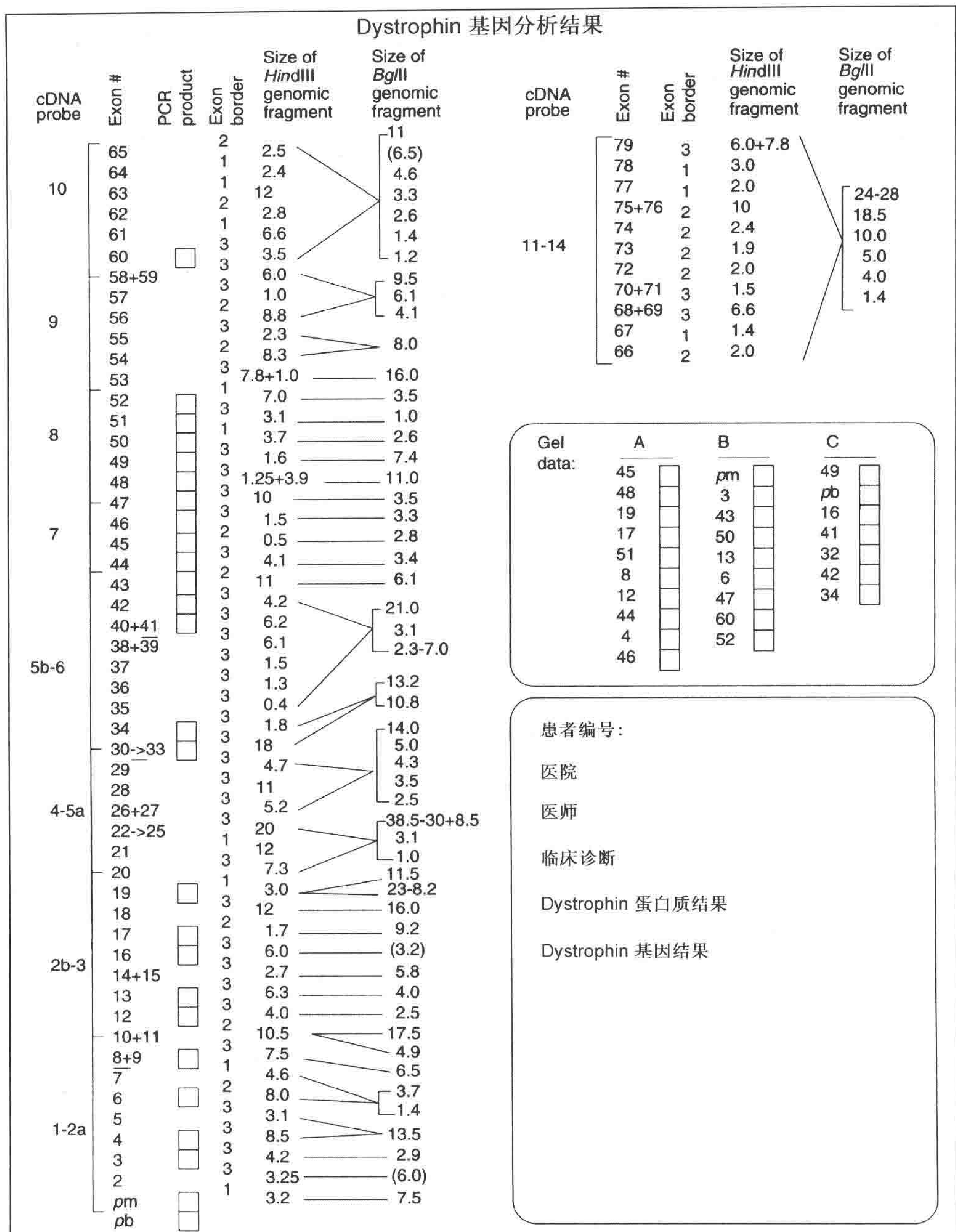


图 9. 1. 3　dystrophin 基因分析结果的标准表格记录。图左所示为从 1-2a～11-14 的 cDNA 探针以及它们所包括的外显子，其中每个外显子对应：方框表示预期的 PCR 产物（做检测或者根据测定结果）；外显子的边界；*Hind*Ⅲ和 *Bg*Ⅲ限制性片段长度的大小。括号表示限制性片段和相应的特定外显子的不确定性。凝胶结果栏：通过比较凝胶图像能够直接检测 PCR 产物是否缺失。患者信息栏：患者的信息能够修改成包含任何一个特点位点的相关信息。通过比较缺失突变两端的外显子边界类型，能预测终点不确定的缺失突变对翻译可读框的影响，通过预测，使两个外显子和相似的外显子边界连到一起的缺失突变能维持可读框不变，这是和 BMD 的诊断相符的；而那些不相似的边界连到一起则会导致可读框移码，一般是和 DMD 相关联。

备用方案　为检测出剂量差别而使用的放射性标记低循环数多重 PCR

接下来的方案通过放射性标记解决了与男性带有重复的营养不良基因和女性缺失型携带者相关的问题。

附加材料

10mCi/ml [α-^{32}P] dCTP（3000mCi/mmol）
低于 2%的琼脂糖胶：pour hot（80℃），必要时预热模式
Centricon 100 浓缩器（Amicon）
带有固定角度转子（23°～45°）的离心机：如 Bechman JA-18.1
Whatman 3MM 滤纸
光密度计或 PhosphorImager

1. 精确地设计一个 PCR 反应体系（基本方案，第 1～5 步），另外在第 2 步的每管反应体系中加 5μCi [α-^{32}P] dCTP（10mCi/ml 0.5μl）。在循环仪上扩增 18 个循环（基本方案，第 6 步）。
2. 供选择：根据操作守则在一个 Centricon 100 浓缩器的桶中收集 2ml 水，从石蜡油下面取出液态的 PCR 产物，并稀释至水中。以 1000g 的转速在一个固定角度转子上离心 30min，去掉未结合的核苷酸。加入 2ml 水重新悬浮样品，再次离心。倒置浓缩器，将浓缩的物质离入 retentate cup 中。
3. 分离出 1/4 纯化的 PCR 产物（常规为 10μl，根据装 Centricon 管子的转子的角度而定），置于中或大号琼脂糖胶上，胶的浓度要一致且小于 2%。
4. 用水简单地清洗一下，将胶表面的放射性物质洗掉。用几片 Whatman 3MM 滤纸将水滴吸干。
5. 将胶放在预热胶干燥器上的一张 Whatman 3MM 滤纸上，并用一张塑料膜盖住。80℃，将胶干燥 30min～1h。
6. 放射自显影照片 2～24h。通过在不同的曝光时间照相，确保有一张照片在线性范围内，用光密度计分析相关的条带的强度，与正常对照进行比较。另外，也可以使用 PhosphorImager。

支持方案　诊断用 PCR 混合物的制备和保存

如果引物的质量好，一般不需要特殊的纯化；然而，为了确保扩增的最大效率和产量，用聚丙烯酰胺胶（CPMB 单元 2.12）纯化值得推荐。因为各种引物在一起会增加盐类物质的污染，如果引物纯化涉及最后的乙醇沉淀步骤，要特别注意尽可能地洗掉盐类物质。检测男性重复和女性杂合缺失是特别敏感的，为求准确可能要求纯化引物。

材料（标√条目参见附录 1）

寡核苷酸 PCR 引物（表 9.1.1、表 9.1.2、表 9.1.3 和表 9.1.4）
无菌双蒸水

√PCR 缓冲液：含 15mmol/L $MgCl_2$ 的 10×PCR 扩增缓冲液

√2.5 mmol/L 4dNTP 混合物

1. 用无菌双蒸水稀释引物至 400ng/μl。将未使用的引物置于 1.5ml 的微量离心管，盖紧，储存在−20℃。分装出一些引物去保存，在特别使用时用来混合其他新的化合物。对于每一对引物，在单独或与少数的其他引物联合使用时，50μl 的 PCR 反应体系中每对引物使用 0.5μl（假设每对引物 26 个碱基，最终浓度为 0.5μmol/L）。
2. 在 1.5ml 微量离心管上标记“pri-A”、“pri-B” 和 “pri-C”，为这三个诊断实验配置引物混合物（假设在 50μl 反应体系中每对引物加 1.0μl），在管中加入如表 9.1.1 所示的等量引物，表 9.1.1(“pri-A”)、表 9.1.2(“pri-B”) 和表 9.1.3(“pri-C”)。
3. 在 1.5ml 微量离心管中，准备主要的最终反应体系，如下所示每组 25 反应/管。

混合物 A	混合物 B	混合物 C	成分
637.5μl	662.5μl	712.5μl	无菌双蒸水
125μl	125μl	125μl	PCR 缓冲液
100μl	100μl	100μl	2.5mmol/L 4dNTP 混合物
250μl (pri-A)	250μl (pri-B)	250μl (pri-C)	混合引物

同时准备多重反应混合物，在−20℃密封保存（如用 Parafilm），≤3 个月，或者在−70℃长期保存。根据实验待处理的数量进行调整，使各组能被整除，但反复冻融不要超过三次。

表 9.1.1　用于诊断的 PCR 引物 A 组[a]

外显子[b]	正向引物(5′→3′)	反向引物(5′→3′)	引物位置[c]	产物大小/bp
45	AAACATGGAACATCCTTGTGGGGAC	CATTCCTATTAGATCTGTCGCCCTAC	I/I	547
48	TTGAATACATTGGTTAAATCCCAACATG	CCTGAATAAAGTCTTCCTTACCACAC	I/I	506
19	TTCTACCACATCCCATTTTCTTCCA	GATGGCAAAAGTGTTGAGAAAAAGTC	I/I	459
17	GACTTTCGATGTTGAGATTACTTTCCC	AAGCTTGAGATGCTCTCACCTTTTCC	I/I	416
51	GAAATTGGCTCTTTAGCTTGTGTTTC	GGAGAGTAAAGTGATTGGTGGAAAATC	I/I	388
8	GTCCTTTACACACTTTACCTGTTGAG	GGCCTCATTCTCATGTTCTAATTAG	I/I	360
12	GATAGTGGGCTTTACTTACATCCTTC	GAAAGCACGCAACATAAGATACACCT	I/I	331
44	CTTGATCCATATGCTTTTACCTGCA	TCCATCACCCTTCAGAACCTGATCT	I/I	268
4	TTGTCGGTCTCCTGCTGGTCAGTG	CAAAGCCCTCACTCAAACATGAAGC	I/I	196
46	GCTAGAAGAACAAAAGAATATCTTGTC	CTTGACTTGCTCAAGCTTTTCTTTTAG	E/E	148

a. 46 号外显子引物引自 Begges 等（1991），其他所有引物引自 Chamberlain 等（1990）；

b. 外显子编号参照 Koening 等（1989），正向和反向是对于编码区而言；

c. I 代表引物序列包含在或包括了邻近内含子序列和剪切信号；E 代表引物只结合在外显子部分。

表 9.1.2 用于诊断的 PCR 引物 B 组[a]

外显子[b]	正向引物（5′→3′）	反向引物（5′→3′）	引物位置[c]	产物大小/bp
pm[d]	gaagatcTAGACAGTGGATACATAA-CAAATGCATG	TTCTCCGAAGGTAATTGCCTC-CCAGATCTGAGTCC	I/E	535
3	TCATCCATCATCTTCGGCAGATTAA	CAGGCGGTAGAGTATGCCAAAT-GAAAATCA	I/I	410
43	GAACATGTCAAAGTCACTGGACT-TCATGG	ATATATGTGTTACCTACCCTTGTCG-GTCC	I/I	357
50	CACCAAATGGATTAAGATGTTCATGAAT	TCTCTCTCACCCAGTCATCACTTCATAG	I/I	271
13	AATAGGAGTACCTGAGATGTAG-CAGAAAT	CTGACCTTAAGTTGTTCTTCCAAAG-CAG	I/I	238
6	CCACATGTAGGTCAAAAATGTAAT-GAA	GTCTCAGTAATCTTCTTACCTAT-GACTATGG	I/I	202
47	CGTTGTTGCATTTGTCTGTTTCAGTTAC	GTCTAACCTTTATCCACTGGAGATTTG	I/I	181
60	AGGAGAAATTGCGCCTCTGAAAGA-GAACG	CTGCAGAAGCTTCCATCTGGTGT-TCAGG	E/E	139
52	AATGCAGGATTTGGAACAGAGGCGTCC	TTCGATCCGTAATGATTGTTCTAGCCTC	E/E	113

a. 46 号外显子引物引自 Begges 等（1990）；

b. 外显子编号参照 Koening 等（1989），正向和反向是对于编码区而言；

c. Ⅰ代表引物序列包含在或包括了临近内含子序列和剪切信号；E 代表引物只结合在外显子部分；

d. *pm* 代表肌肉特异性启动子和第 1 个外显子，小写字母表为设计的 *Bgl* Ⅱ 酶位点。

表 9.1.3 用于诊断的 PCR 引物 C 组[a]

外显子[b]	正向引物（5′→3′）	反向引物（5′→3′）	引物位置[c]	产物大小/bp
49	GTGCCCTTATGTACCAGGCAGAAATTG	GCAATGACTCGTTAATAGCCTTAAGATC	I/I	439
*p*b	TCTGGCTCATGTGTTTGCTCCGAGGTATAG	CTTCCATGCCAGCTGTTTTTCCTGTCACTC	I/E	332
16	TCTATGCAAATGAGCAAATACACGC	GGTATCACTAACCTGTGCTGTACTC	I/I	290
41	GTTAGCTAACTGCCCTGGGCCCTGTATTG	TAGAGTAGTAGTTGCAAACACATACGTGG	I/I	270
32	GACCAGTTATTGTTTGAAAGGCAAA	TTGCCACCAGAAATACATACCACACAATG	I/I	253
42	CACACTGTCCGTGAAGAAACGATGATGG	CTTCAGAGACTCCTCTTGCTTAAAGAGAT	E/E	195
34	GTAACAGAAAGAAAGCAACAGTTGGAGAA	CTTTCCCCAGGCAACTTCAGAATCCAAA	E/E	171

a. 49 号外显子引物引自 Begges 等（1990），其他所有引物引自 Kunkel 等（1991）；

b. 外显子编号参照 Koening 等（1989），*p*b 代表脑特异性启动子引自 Boyce 等（1991），正向和反向是对于编码区而言；

c. Ⅰ代表引物序列包含在或包括了邻近内含子序列和剪切信号；E 代表引物只结合在外显子部分。

表 9.1.4 其他多个 Dystropin 基因外显子扩增引物[a]

外显子[b]	正向引物（5′→3′）	反向引物（5′→3′）	引物位置[c]	反应条件[d]	产物大小/bp	Ref.[c]
*p*b-2	CTTTCAGGAAGATGACAGAATC	CCTGTCACTCCATCATGCC	E/E	60/72	95	1
*p*m-2	TCACTTTCCCCCTACAGGACTC	ACAGTCCTCTACTTCTTCCCA	E/E	55/72	229	2
*p*m-3	CTTTCCCCCTACAGGACTCAG	GTCCTCTACTTCTTCCCACC	E/E	60/72	223	1
2-1	AGATGAAAGAGAAGATGTTCAAAAG	AATGACACTATGAGAGAAATAAAACGG	E/I	55/63	174	3
2-2	GAAAGAGAAGATGTTCAAAAG	CTTAGAAAATTGTGCATTTAC	E/E	60/72	60	1
3-2	GGCAAGCAGCATATTGAGAAC	CCCTGTCAGGCCTTCGAGGAG	E/E	60/72	81	1
5	GTTGATTTAGTGAATATTGGAAGTAC	CTGCCAGTGGAGGATTATATTCCAAA	E/E	55/63	93	3
7-1	TATTTGACTGGAATAGTGTGGTTTGC	CTTCAGGATCGAGTAGTTTCTCTA	E/E	55/63	111	3
7-2	CTATTTGACTGGAATAGTGTG	CAGGATCGAGTAGTTTCTC	E/E	60/72	109	1

续表

外显子[b]	正向引物（5′→3′）	反向引物（5′→3′）	引物位置[c]	反应条件[d]	产物大小/bp	Ref.[e]
7-3	AGACCTATTTGACTGGAATAGT	CAGGATCGAGTAGTTTCTCTATGCC	E/E	55/68	113	4
8-2	ATGTTGATACCACCTATCCAG	TCTTTAGTCACTTTAGGTGGCC	E/E	50/63	140	5
8-3	CCTATCCAGATAAGAAGTCC	CTTTAGGTGGCCTTGGCAAC	E/E	60/72	117	1
9	ATCACGGTCAGTCTAGCACA	TGAAGGAAATGGGCTCCGTGTA	E/E	55/68	126	4
11-1	GTACATGATGGATTTGACAGC	CATGCTAGCTACCCTGAGGC	E/E	60/72	166	1
11-2	GGATTTGACAGCCCATC	GCTTTGTTTTTCCATGC	E/E	55/68	169	4
11-3	CAAAATAAAACTCAAAAACCACACC	CTTCCAAAACTTGTTAGTCTTC	I/I	53/65	303	6
14	GTATTGGGAGATC	CTGTTCTTCAGTAAGACGTTGCC	E/E	55/68	102	4
20-1	GTGTTAATGCAGATAGCATCAAAC	ACAAATTTTTAACTGACTTTTAATTG	E/E	51/65	239	7
20-2	GCAGATAGCATCAAACA	CTGACTTTTAATTGCTG	E/E	55/68	216	4
20-3	TGGCTTTCAGATCATTTCTTTC	AAATACCTATTGATTATGCTCC	I/I	53/65	357	6
21-1	GAAGTCAACCGGCTATCAGGTCCT	TCTGTAGCTCTTTCTCTCTGGCCT	E/E	65/65	175	8
21-2	GTTCCTGGATGCAGACTTTGTG	TTGGAAAATGTCAAGTTAGCC	E/E	60/72	130	1
21-3	GATGAAGTCAACCGGCTATCA	CACAAAGTCTGCATCCAGGAA	E/E	55/68	114	4
21-4	GCAAAATGTAATGTATGCAAAG	ATGTTAGTACCTTCTGGATTTC	I/I	53/65	319	6
22	TTGACACTTTGCCACCAATGCGCTATC	CAATTCCCCGAGTCTCTGCTCCATG	E/E	51/65	140	7
23-1	GCTTTACAAAGTTCTC	CTGAATTTTTCGGAGT	E/E	55/68	213	4
23-2	GTCATAACTGATAGAAGATCATC	TTTACAGTTTACAGTGTATCGTTAG	I/I	53/65	423	6
24	AATCACATACAAACCC	TCTGCACTGTTTCAGC	E/E	55/68	114	4
25	CAATTCAGCCCAGTCTAAAC	CTGAGTGTTAAGTTCTTTGAG	E/E	60/72	113	1
26	GTCTATGCCAGAAAGGAG	CTTCATCTCTTCAACTGC	E/E	55/68	171	4
27-1	GCTAAAGAAGAGGCCCAAC	GGCCTCTTGTGCTACAGGTGG	E/E	60/72	113	1
27-2	AGAGCTAAAGAAGAGG	AAAGGCTTGCATTTCC	E/E	55/68	183	4
28	GAAGTTTGGACATGTTGG	AGCACCTCAGAGATTTCC	E/E	55/68	135	4
29-1	CATTCAGAGGATAACCCAAATCAGATT	GTTCCCTCCAACGAGAATTAAATGT	E/E	65/65	117	8
29-2	AATTTGATGCGACATTC	CTCTTCATGTAGTTCC	E/E	55/68	150	4
29-3	CCAATGTATTTAGAAAAAAAAGGAG	GCAAATTAGATTAAAGAGATTTTCAC	I/I	53/65	242	6
30	GCTGTAAGGCAAAAG	CTGGGCTTCCTGAGGC	E/E	55/68	159	4
32	AAATTACAAGATGTCTCC	CACACAATGATTTAGCTG	E/E	55/68	174	4
33-1	GTCTGAGTGAAGTGAAGTCTG	CAAAGCTGTTACTCTTTCATC	E/E	60/72	133	1
33-2	CTTGTATAAAAGTCTGAG	ACCTTTGCTCCCAGC	E/E	55/68	155	4
34-1	AGAAAGAAAGCAACAG	CCCCAGGCAACTTCAG	E/E	55/68	164	4
34-2	CAGAAATATAAAAGTTCCAAATAAGTG	CATGTTAATACTTCCTTACAAAATC	I/I	53/65	338	6
35-1	AGAGATTGAGAAACAG	AACAAAAGATTTAACC	E/E	55/68	175	4
35-2	CCGTTTCATAAGCATTAAATC	AGCTTCTAGCCTTTTCTC	I/I	53/65	271	6
37	CACTGCAGGAAATTAGTAGAGC	AATGGAGGCCTTTCCAGTCTT	E/E	55/68	172	4
39-1	CAACTTACAACAAAGAATCACAG	CTTGAGAGCATTATGTTTTGTC	E/E	60/72	91	1
39-2	AATGAAGACAATGAGG	CTTGAGAGCATTATG	E/E	55/68	138	4
40-1	GGTATCAGTACAAGAGGCAG	CCTTTCATCTCTGGGCTCAG	E/E	60/72	95	1
40-2	GAGGTCTCAAAGAAG	TTCATCTCTGGGCTC	E/E	55/68	153	4
41-1	ATTGATCGGGAATTGC	CAAAGTTGAGTCTTCG	E/E	55/68	183	4
41-2	TGTGGTTAGCTAACTGCCCT	GAGTAGTAGTTGCAAACACATACG	I/I	53/65	276	6
42-2	CACACTGTCCGTGAAGAAACGATGATG	TTAGCACAGAGGTCAGGAGCATTGAG	E/E	60/72	155	9
42-3	GAGCCAACTCAGATCCAGCTCA	AATTTGTGCAAAGTTGAG	E/E	55/68	195	4
44-2	CGATTTGACAGATCTGTTGAG	GCATGTTCCCAATTCTCAGG	E/E	60/72	125	1
45-2	GCGGCAAACTGTTGTCAGAACA	GGCATCTGTTTTGAGGATTGC	E/E	50/63	73	5
45-3	CTGGAGCTAACCGAGAGGTGC	CATTCCTATTAGATCTGTCG	I/I	60/60	428	10
45-4	CTCCAGGATGGCAATGGCAG	CTGTCTGACAGCTGTTTGCAG	E/E	60/72	164	1
46-2	ATTTGTTTTATGGTTGGAGG	GCTTTTCTTTTAGTTGCTGC	E/E	60/72	83	1
46-3	CTAGAAGAACAAAAGAATATC	TTGCTGCTCTTTTCCAGGTTC	E/E	55/68	121	4
50-2	ATTAAGCATGTTGCTGAGAGGGAACTG	GCCTCTGCTGCAGACAAATCACATTTC	I/I	55/63	712	11
51-2	CCCAAAATATTTTAGCTCCTACTCAG	CTTGATTATACTTAGGCTGAATAGTG	I/I	55/63	409	12
51-3	CTGCTCTGGCAGATTTCAAAC	GTCACCCACCATCACCCTCTG	E/E	60/72	98	1
52-2	AATGCAGGATTTGGAACAGAGGCGTCC	TTCGATCCGTAATGATTGTTCTAGCCTC	E/E	60/72	113	1
53-1	TTGAAAGAATTCAGAATCAGTGGGATG	CTTGGTTTCTGTGATTTTCTTTTGGATTG	E/E	60/72	212	9
53-2	GAAAGAATTCAGAATCAGTGGGATG	CTTCCATGCCTCAAGCTTGGCTCT	E/E	55/68	212	4
54-1	AGGATTCAGAAGCTGTTTACGAAGT	AATCCTCATGGTCCATCCAGTTTCA	I/I	55/72	329	13
54-2	GACCTCCGCCAGTGGCAGAC	GAATGCTTCTCCAAGAGGC	E/E	60/72	136	1
55	ATGAGTTCACTAGGTGCACCATTCT	TGTTCAATTGGATCCACAAGAGTGC	I/I	55/72	303	13
56-1	GGTGAAATTGAAGCTCACAC	GTAACAGGACTGCATCATCG	E/E	60/72	100	1
56-2	CTCCAAGGTGAAATTGA	GAGACTTTTTCCGAAG	E/E	55/68	173	4

续表

外显子[b]	正向引物（5′→3′）	反向引物（5′→3′）	引物位置[c]	反应条件[d]	产物大小/bp	Ref.[e]
57	GTCCGATTTGGAAGC	GTACATCGTTCTGCT	E/E	55/68	157	4
59	GAGGCCACGGATGAGCTGG	GGTGATCTTGGAGAGAGTC	E/E	60/72	103	1
60	TAAATATTCTCATCTTCCAATTTGC	TTACTGTAACAAAGGACAACAATG	I/I	58/72	231	14
61-1	AATGAGAGAACATAATTTCTCTCC	AATCAAGATGCAATAAAGTTAAGTG	I/I	58/72	163	14
61-2	ACATAATTTCTCTCCTTTTCC	CAAGATGCAATAAAGTTAAGTG	I/I	53/65	150	6
62	TAATGTTGTCTTTCCTGTTTGCG	ATACAGGTTAGTCACAATAAATGC	I/I	58/72	185	14
63	TACTCATGGTAAATGCTAAAGTC	TAGCAAAGTAACTTTCACACTGC	I/I	58/72	194	14
64-1	TTTCTGATGGAATAACAAATGCTC	ATCAAGATCTTCAAATACTGGCC	I/I	58/72	151	14
64-2	TTCTGATGGAATAACAAATGCT	CCTACTTTTTATTCTAAGCAAAGA	I/I	53/65	180	6
65	TATGAGAGAGTCCTAGCTAGG	TAAGCCTCCTGTGACAGAGC	I/I	58/72	347	14
66-1	CAGGGAGGATCCGTGTCCTG	GTCTTCCAAATGTGCTTTAC	E/E	60/72	68	1
66-2	TCTGCTTTGATTCTTCATAATAGG	ATCTAGAACTAGGGTAATTAGCC	I/I	58/72	173	14
66-3	GTCTAGTAATTGTTTTCTGCTTTG	ATAAGAACAGTCTGTCATTTCCC	I/I	53/65	211	6
67	AATTGCTACTGGAATTGAGTTGG	AAGAATAAATATGTTACCTAGAAGG	I/I	58/72	286	14
68	TAATCGAACTGATATACACCTCC	ACTAACAGCAACTGGCACAGG	I/I	58/72	352	14
69-1	TCAAATTAGAACGTGGTAGAAGG	GAACTAACTCTCACGTCAGGC	I/I	58/72	242	14
69-2	GAACGTGGTAGAAGGTTTATTAAA	CTAACTCTCACGTCAGGCTG	I/I	53/65	231	6
70-1	TCCTAAATCTGATCTCACCATG	ATCAAACAAGAGTGTGTTCTGC	I/I	58/72	210	14
70-2	TGGTCATTAGTTTTGAAATCATC	CATCAAACAAGAGTGTGTTCTG	I/I	53/65	237	6
71	AAAGCGTGTGTCTCCTTCACC	ATGTGTTGGTGGTAGCAGCAC	I/I	58/72	125	14
72	GATGGTATCTGTGACTAATCAC	ATTTCAATCAATATTTGCCTGGC	I/I	58/72	144	14
73	ACGTCACATAAGTTTTAATGAGC	ATGCTAATTCCTATATCCTGTGC	I/I	58/72	202	14
74	ACCAAAACCTTTGATTTTATTTTCC	TTTCTATGTGTGCAAGTGTATGC	I/I	58/72	248	14
75	TCTTTTTTACTTTTTTGATGC	AGTGCTCTCTGAGGTTTAG	I/I	58/72	344	14
76-1	AAGTAATTCTGTTTTCTTTTGGATG	CTTCAGACAACAAAATCTGAGAG	I/I	58/72	196	14
76-2	GTAATTCTGTTTTCTTTTGGATG	CTACCTTTCTTCAGACAACAAAAT	I/I	53/65	198	6
77	TAATCATGGCCCTTTAATATCTG	TAATCATGGCCCTTTAATATCTG	I/I	58/72	270	14
78	TTCTGATATCTCTGCCTCTTCC	AATGAGCTGCAAGTGGAGAGG	I/I	58/72	220	14
79-1	AGAGTGATGCTATCTATCTGCAC	TGCATAGACGTGTAAAACCTGCC	I/E	58/72	349	14
79-2[f]	GAAAGATTGTAAACTAAAGTGTGC	GGATGCAAAACAATGCGCTGCCTC	E/E	65/65	123-137	15
79-3[f]	atgATCAGAGTGAGTAATCGGTTGG	atatcgatCTAGCAGCAGGAAGCTGAATG	E/E	65/65	78/82	16

a. 此表所列为用于外显子扩增的 PCR 引物。一些引物被用于扩增同一个外显子，以验证外显子缺失。其他一些引物用于确认缺失端点或者可读框改变。所有扩增反应必须按照 PCR 扩增方法，并做内对照等对照。

b. 外显子编号参照 koening 等（1989）和 Roberts 等（1992b）在诊断中检测过的可替代引物在表中用“－1”，“－2”，“－3”，“－4”标出。

c. Ⅰ代表引物序列包含在或包括了临近内含子序列和剪切信号；E 代表引物只结合在外显子部分。

d. 反应条件，即退火温度（1min）、延伸温度（3min）；这些引物还可以用其他条件，进行多种扩增用途

e. 参考文献：(1)Coffey 等，1992；(2)Sakuraba 等，1991；(3)Begges 等，1991；(4)Prior 等，1995；(5)Hentemann 等，1990；(6)den Dunnen，pers. comm；(7)Covone 等，1992；(8)Meng 等，1991；(9)Abbs等，1991；(10)Blonden 等，1989；(11)Kilimann 等，1992；(12)Speer 等，1989；(13)K. Friedman，pres comn；(14)Lenk 等，1999；(15)Beggs 和 Knnkel，1990；(16)Roberts 等，1989

f. 这些引物扩增 3′端非翻译区，有效的检测部分 3′端非翻译区，小写字母表为设计的酶切位点，并不是 dystrophin 基因序列。

参考文献：Beggs *et al.*，1990；Chamberlain *et al.*，1988

编者：Alan H. Beggs

单元 9.2　利用等位基因特异性寡聚核苷酸（Allelespecific oligonucleotide，ASO）同时检测多点突变

基本方案　多池 ASO 筛查 PCR 扩增的 DNA

在以下方案中，放射性标记的 ASO 探针池用来与含有从一个或多个位点进行 PCR 扩增的 DNA 片段的斑点印迹杂交（图 9.2.1）。本方法对于筛查少见的等位基因和缺

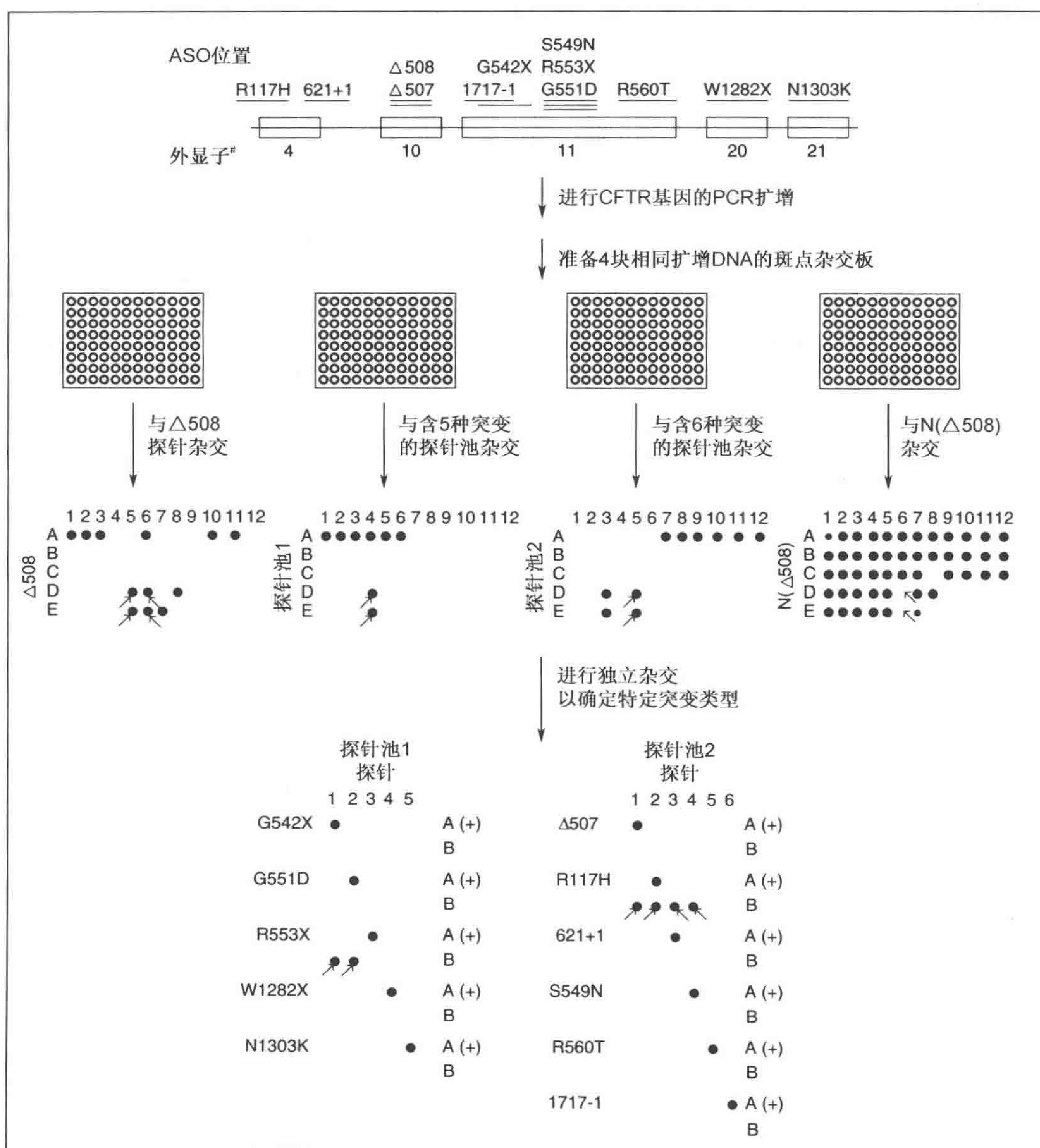


图 9.2.1　通过单体特异性寡核苷酸检测 CFTR 基因突变。

失/插入突变特别有效，但不适用于常见的等位基因的筛查。

本法的显著优点在于 ASO 探针只需注意两个参数：①同一个探针池中所有 ASO 探针长度一致（本方案中优化的 ASO 探针长度为 17 个碱基对）；②寡核苷酸探针和目标序列的错配单碱基位置不可位于 ASO 探针的末端（本方案是基于单个错配碱基位于距离 ASO 探针 5′端 5～7 个碱基对）。

表 9.2.1 列出了本法的问题解决指导。

表 9.2.1　单体特异性寡核苷酸探针进行突变分析的问题解决指导

问题	可能原因	解决方法
样品杂交信号低或无	标记的 ASO 探针特异结合力差	用新鲜的 ASO 及探针重复标记步骤
	探针部分水解或降解	准备新的探针
	PCR 扩增的 DNA 样品中未加变性液	变性、spot、杂交从扩增的样品分出另两份
	杂交混合液中未加探针	在杂交溶液中加入探针，按照常规步骤进行实验
	没有 DNA 印迹到膜上	重复变性、spot 与新的 DNA 扩增样品进行杂交
背景信号高	杂交及洗脱温度不够高	不让杂交膜干透，将湿润的杂交膜置入新的洗脱液中并按照给定的温度反复洗脱，忽略室温洗脱程序
	洗脱后标记探针仍残留在膜上	按要求的洗脱温度进行额外的 5～10min 的洗脱
	洗脱时的振荡速率慢	提高振荡速率重复洗脱，并检查确认杂交膜没有黏着在容器内侧壁
	洗脱液容积不够	加洗脱液重复洗脱
各孔信号不一致；孔与孔之间出现信号	印迹时真空抽吸不够，导致泄露或不稳定印迹	重复 blot 步骤并按照常规步骤进行实验
各行之间的背景信号不一致	变性不彻底或印迹时变性剂添加量不对	重复变性、spot，用新鲜配制的溶液与新的 DNA 扩增样品进行杂交
扩增成功的样品出现阳性对照信号弱	DNA 抽提、扩增或印迹过程中可能污染	重新抽提样品，用原来的样品及重新抽提的样品重复实验
	与其他序列发生交叉杂交	如果信号弱可重复，采用其他方法分析序列

材料（标√的条目参见附录 1）

√10× T4 多聚核苷酸激酶缓冲液（或酶生产商提供的缓冲液），－20℃保存

1×TE 缓冲液溶解的 2μmol/L ASO 工作液（附录 1），包括所有正常及突变序列（从－80℃保存的 100μmol/L 库存或集中冻干 ASO 配制）

10mCi/ml [γ-^{32}P] dATP（3000Ci/mmol），－20℃保存

10U/<μl T4 多聚核苷酸激酶，－20℃保存

√2×SSC

√变性溶液，新鲜配制

从兴趣基因 PCR 扩增获得的 DNA（单元 7.1、单元 9.1 和 CPMB 单元 15.1）

阳性对照：从有已知纯合或杂合突变（推荐）的个体、细胞系或克隆（单元 7.1 和 CPMB 单元 15.1）PCR 扩增获得的 DNA

阴性对照：从无突变个体（推荐）、细胞系或克隆（单元 7.1 和 CPMB 单元 15.1）PCR 扩增获得的 DNA

√TMAC 杂交溶液，新鲜配制

√TMAC 洗脱液，新鲜配制，置于室温和 52℃

37℃恒温槽

斑点-印迹设备（提供的柱子适于 6mm 斑点）

尼龙膜，如 Biotrans+（ICN Biomedicals）或 Biodyne（Pall）

Whatman 3MM 滤纸

80℃真空烤炉

可封口袋、Tupperware 容器或杂交管

52℃振荡水浴或杂交炉

Kodak Biomax MS 胶片

X 线片盒和增光屏

用 ^{32}P 标记个体 ASO

1a. 对于每个待标 ASO，准备下列标记反应：

0.75μl H_2O；

1.00μl 10×T4 多聚核苷酸激酶缓冲液；

5.00μl 2μmol/L ASO 工作液；

3.00μl 10mCi/ml [γ-^{32}P] ATP；

0.25μl 10U/μl T4 多聚核苷酸激酶；

37℃恒温槽孵育 1h。

2a. 加 90μl 水，混匀，稍做离心并收集试管底部溶液，马上使用或－20℃保存。

^{32}P 标记 ASO 探针池

1b. 对于每个 ASO 探针池，须确定探针池中 ASO 的总皮摩数。注意探针池中 ASO 的总皮摩数对 10mCi/ml [γ-^{32}P] ATP 的体积比值应为 3.3。调整第 1a 步中总反应及各反应组分的体积以保证该比值。37℃恒温槽孵育 1h。

2b. 加 4 倍体积的水，混匀，稍做离心并收集试管底部溶液，马上使用或－20℃保存。

3. 按制造商要求准备点杂交设备，如有必要，清洗相关设备。

4. 剪一块与点杂交设备大小相适应的尼龙膜。在干胶上做不对称标记以便于杂交后确定方向。

5. 将膜漂浮于水面使其湿润（膜应该立即湿润），然后浸没直至使用，以 2× SSC 溶液部分充填一容器。

6. 对于每个要杂交到膜上的样品，加 92μl 变性液至 8μl 兴趣基因的 PCR 扩增产物（最多 11 种不同产物）或多重 PCR 产物（每一产物 200ng）中。振荡混匀。同时准备阳性对照、阴性对照及 PCR 反应对照（即不含模板 DNA）。

7. 放膜在点杂交仪垫板上，安装斑点杂交板 。在载样前不要使用真空抽吸。

8. 当所有的样品都与变性液混匀后，对点杂交设备进行真空抽吸。所有样品全部加入到对应的孔，避免膜上产生气泡。小心不要触摸或戳破过滤器。

9. 在真空抽吸状态下，拿开点杂交设备的上层封盖，快速拿开杂交膜，并将膜上多余

的液体用 Whatman 3MM 过滤纸吸干。

10. 把膜置于含 2×SSC 溶液容器中 5min，然后用 Whatman 3MM 过滤纸吸干。
11. 真空抽吸状态下，在垫板上覆盖一张塑料薄膜以去除设备中残留的任何液体。以纸巾汲取其他任何可见液体。
12. 通过 80℃烤箱恒温孵育 1h，将 DNA 固定于膜上。
13. 将膜在水中放置 5min 以上充分湿润，然后置于一可封口袋、Tupperware 容器或杂交管。
14. 加适量的含^{32}P 标记 ASO 探针的 TMAC 杂交液（根据经验决定探针浓度，但应在 0.03～0.15pmol/ml）置每张膜上并密封容器。如有必要，可根据“正常单体”加≥20 倍过量的未标记的 ASO 以降低杂交背景。
15. 从袋中拿出膜并按照以下步骤剧烈搅动进行洗脱：室温，在 200ml（多张膜则需 1000ml）TMAC 洗脱液中洗脱 20min，然后在 52℃预热的 300ml TMAC 洗脱液（多张膜则需 1000ml）中洗脱 20min。如背景仍高，则加 5min 的室温预洗脱步骤。
16. 将膜置于 Whatman 3MM 过滤纸上吸干，室温下在 X 线影像盒中对 BioMax 胶片曝光 15min～1h。

支持方案　条带化旧探针及复杂交

杂交膜可以事先用杂交的探针条带化并反复杂交多次，都取决于膜上 DNA（包括实验及对照 DNA）的量。如果信噪比值可有效判读阳性、阴性及空白对照的杂交信号，同时膜上实验和对照 DNA 的量相等，则可对实验结果进行分析。

附加材料（基本方案；标√的条目参见附录 1）

杂交膜（基本方案）
√TMAC 洗脱液，新鲜配制并预温至前次杂交温度 15℃以上
流动水浴，水温为前次杂交温度 15℃以上

1. 把杂交过的膜置于含 300ml 预温 TMAC 洗脱液的洗脱容器中。在前次杂交温度 15℃以上水浴中剧烈振荡洗脱 1h。
2. 从水浴中取出杂交膜并在 Whatman 3MM 滤纸上吸干。
3. 自显影以确定前次杂交探针已去除。
4. 按上述步骤进行杂交或室温干燥保存杂交膜。可储存在能反复开启的袋子里。

参考文献：Shuber *et al.*，1992，1997

编者：Nichole M. Napolitano，Elizabeth M. Rohlfs and Ruth A. Heim；Barbara Handelin and Anthony P. Shuber

单元 9.3　脆性 X 综合征的分子分析

基本方案 1　脆性 X 重复片段的 PCR 扩增

对 CGG 重复片段的 PCR 分析要比 Southern 分析（基本方案 2）快，且能够准确确

定正常片段（6～45 次重复）、中间状态（45～55 次重复）及前突变单体情况（55～200 次重复；图 9.3.1）。PCR 同时也能够检测出各世代间重复次数的小的改变。在 PCR 反应中用 7-deaza-2′-dGTP 代替 dGTP 可以完成常规 PCR 反应无法完成的全突变（>200 次重复）的扩增。

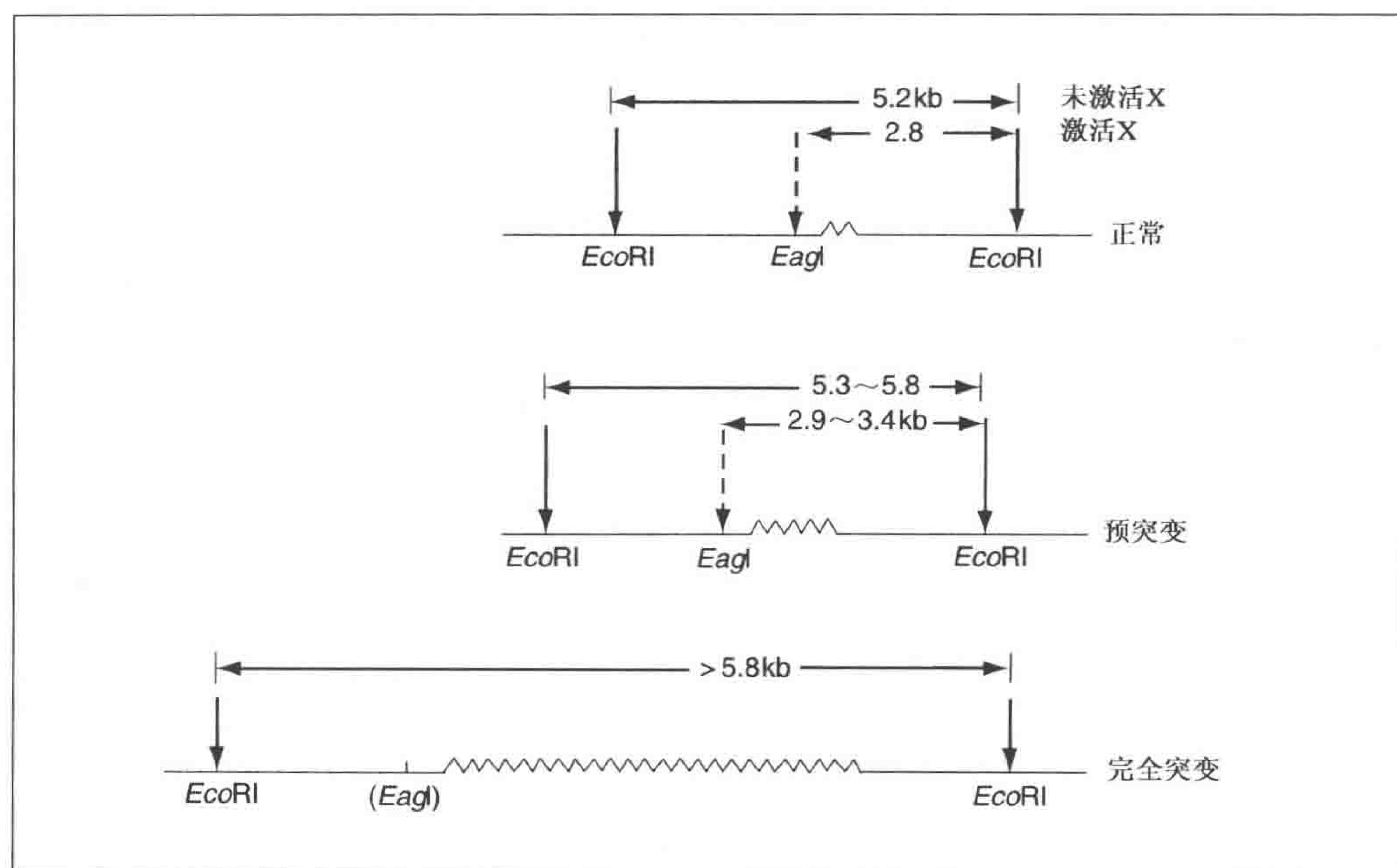


图 9.3.1　正常、前突变和全突变 CGG 重复的脆性 X 区域图。曲线处表示重复区域，实现箭头所指为酶切位点 *Eco*R Ⅰ，虚线箭头所指为 *Eag* Ⅰ。

注意：涉及 PCR 的操作必须相当小心以避免污染。

材料（标√的条目参见附录 1）

10×PCR 扩增缓冲液：100mmol/L Tris · Cl，pH8.3（附录 1）/500mmol/L KCl

25mmol/L $MgCl_2$

√10 mmol/L dNTP 混合物包括 dATP、dCTP、dTTP 和 7-deaza-2′-dGTP（Roche 诊断试剂）

10μmol/L 寡核苷酸引物 1、3 于 10mmol/L Tris · Cl，pH 7.5（附录 1）/1mmol/L EDTA

引物 1：5′-GACGGAGGCGCCGCTGCCAGG-3′

引物 3：5′-GTGGGCTGCGGGCGCTCGAGG-3′

DMSO（Sigma）

5U/μl *Taq* 酶（Applied Biosystems）

pH7.5 TE 缓冲液（附录 1）溶解的 0.3～1μg/μl 纯化的 DNA 样品（附录 3B）

SequaGel-6（National 诊断试剂；可选）

√0.67×和 2.8×TBE 缓冲液

√载样液

^{32}P 标记的 DNA marker（如 *Msp* Ⅰ 酶切消化 pBR322 的产物，*Bst*EⅡ酶切消化 λ 的产物，或几个 PCR 扩增片段已知的女性杂合子的 DNA 样品混合物）

0.4mol/L NaOH

√2×SSC

快速轻便杂交试剂盒（Orchid Biosciences）包括：

快速轻便缓冲液浓缩物

洗脱液 1、2

杂交液

快速轻便基因组作图探针试剂盒（Orchid Biosciences）包括：

碱性磷酸酶标记的（CGC）$_n$ 寡核苷酸探针

Lumi-Phos 喷雾器

循环热反应仪

100℃和 55℃水浴

垂直凝胶电泳设备（如 BRL V15.17，Life Technologies）

无粉手套

正电荷尼龙膜（Biotrans＋，ICN Biomedicals），12cm×16cm

电转染设备（Intergrated Separation Systems）

80℃ 真空炉

1. 按以下组分在 1.5ml 微量离心管中准备每次 PCR 反应混合物（为保证足量，＜20 个样品准备 $n+1$ 份，≥20 个样品则准备 $n+2$ 份）：

   1μl 10×PCR 扩增缓冲液（终浓度为 1×）；

   0.3μl 25mmol/L $MgCl_2$（终浓度为 0.75mmol/L）；

   0.8μl 10mmol/L dNTP 混合物（各 dNTP 终浓度为 200μmol/L）；

   5μl 10μmol/L 的引物 1（终浓度为 0.5μmol/L）；

   5μl 10μmol/L 的引物 3（终浓度为 0.5μmol/L）；

   1μl DMSO（终浓度为 10%）；

   0.05μl 5U/ml *Taq* DNA 聚合酶（0.25U）；

   4.85μl H_2O。

2. 取 9μl 上述 PCR 反应混合液至标记好的 0.2ml 微量离心管管底。
3. 稀释样品 DNA 至 30～100ng/μl，振荡，每个 PCR 反应加 1μl DNA（50～100ng DNA 可有较好扩增）。
4. 将样品置入 PCR 反应仪中，按以下条件进行扩增：

起始步骤：	4min	94℃（加热）
30 个循环：	1min	94℃（变性）
	1min	63℃（退火）
	2min	72℃（延伸）

5. 在一小型垂直电泳设备上（如 BRL V15.17；附录 3F）准备含 8.3mol/L 尿素的 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶。或者准备使用 SequaGel-6。在 0.67×TBE 缓冲液中，以约

500V 恒定电压预电泳 30min 左右。

6. 每个 PCR 产物取 2～4μl 与 2 倍体积的载样缓冲液混合，并振荡混匀。置样品于 100℃水浴 1min，然后置于冰上（或 4℃）。上样，其中包括两孔 0.4nCi ^{32}P 标记的 DNA 分子质量标记。
7. 在 0.67×TBE 缓冲液中，以 500V 恒定电压电泳 90min 左右。电泳完成后，将胶修整至 12cm×16cm 大小，以适应预先切好的膜片。
8. 戴无粉手套，在凝胶上覆盖一张塑料薄膜。以铲板抬起凝胶一侧，使其与塑料薄膜黏附，然后将凝胶转移至薄膜上。塑料薄膜一侧朝下，凝胶一侧朝上，将凝胶展平放好。将带正电、预先切好（12cm×16cm）的尼龙膜盖在凝胶上，避免产生气泡。以 2.8×TBE 湿润三张滤纸，放置在胶上。
9. 把电转仪的下面部分置于纸上，翻转，使凝胶面朝上。将凝胶上的塑料薄膜移除。在胶上放置三张 2.8×TBE 湿润的滤纸以完成整个三明治夹心。小心转动移液枪枪头除去三明治结构中的任何气泡（重要）。放置电转设备的上部于三明治结构上。根据生产厂商要求，以 $3mA/cm^2$ 恒定电流电转 30min。
10. 将尼龙膜与三明治结构分离，DNA 面朝上，放置于 0.4mol/L NaOH 湿润的 Whatman 3MM 滤纸上，静置约 10min。
11. 100ml 2× SSC 溶液洗膜 5min。以 Whatman 3MM 滤纸吸干，将膜置于 80℃ 真空炉 15min。
12. 探针杂交参照 Quick-Lite Hybridization 及 Genome Mapping 试剂盒（或者参照单元 9.4 的基本方案 1）如下。
    a. 开始前将所有洗脱溶液预温至 55℃。
    b. 35ml 55℃洗脱液Ⅰ中将膜预湿 5min。
    c. 除去洗脱液Ⅰ，加入 30ml 杂交液及 4μl 以碱性磷酸酶标记的 $(CGC)_n$ 探针。55℃杂交 20min。
    d. 50ml 洗脱液Ⅰ 55℃洗脱 20min。倒去溶液。
    e. 50ml 洗脱液Ⅱ 55℃洗脱 20min。
    f. 室温下，以 50ml 1×Quick-Light 缓冲液清洗两遍，共 5min。
    g. 将膜置于塑料袋中，一侧封口。以 Lumi-Phos 喷 6～8 次。
13. 将塑料袋中气泡除去，封口，清除塑料袋外侧多余的 Lumi-Phos。37℃ 曝光 X 线片适当的时间（根据探针使用的量）。

基本方案 2 直接 Southern 杂交检测异常扩增和甲基化

CGG 重复次数扩增水平和甲基化程度都可以通过基因组 Southern 杂交检测。

注意：由于包含全突变的限制性片段可能＞10kb 而且大小存在异源性差别，因此源 DNA 分子质量必须足够大以保证全突变的检测。

材料（标√的条目参见附录 1）

0.5～1μg/ml 基因组 DNA（附录 3A）
√5×限制性缓冲液

0.1mol/L DTT（Sigma）
3U/ml RNase A（Sigma）
100U/μl *Eco*RⅠ（New England Biolabs）
50U/μl *Eag*Ⅰ（New England Biolabs）
√10×Ficoll 载样缓冲液
√1×TAE 缓冲液，pH8.5
√变性缓冲液
√转化缓冲液
√中性缓冲液
√杂交缓冲液
30～50μCi/ml［α-^{32}P］StB 12.3 探针（3000mCi/mmol，Amersham；或无标记，de Chimie Bioloqique 大学 J. L. Mandel 博士提供，mandeljl@igmc. u-strsbg. fr）
√2×SSPE/0.1%（*m/V*）SDS（新鲜配制）
√1×SSPE/0.1%（*m/V*）SDS（新鲜配制）
√0.1×SSPE/0.1%（*m/V*）SDS，60℃（新鲜配制）
√20×SSPE
Whatman 3MM 滤纸
Nytran SuPercharge Turboblotter Rapid Downward Transfer 系统和膜（Schleicher & Schuell）
80℃烤炉
60℃杂交炉
UV 透明塑料薄膜

1. 做好标记的 1.5ml 微量离心管中加入约 10μg 基因组 DNA。用灭菌水加至总体积 20μl（基因组 DNA 会比较黏滞，因此精确测量体积会较困难）。以灭菌水加至总体积 29μl。以移液枪打匀。不要振荡。
2. 按以下顺序加样：
   8μl 5×限制性缓冲液；
   0.4μl 0.1mol/L DTT；
   0.4μl 3U/μl RNase A。
3. 每管加入 1μl（100U）*Eco*RⅠ 和 1μl（50U）*Eag*Ⅰ（限制酶酶切图见图 9.3.2）。以最大转速离心 2s 以确保各组分混合。37℃孵育过夜（16～20h）。
4. 加 4μl 10×Ficoll 载样缓冲液，振荡，点离。
5. 将样品（总体积 40μl 左右）加至 14cm×11cm×0.6cm 大小 0.8%（*m/V*）的琼脂糖凝胶的 0.8cm×10cm 点样孔中，琼脂糖凝胶含 0.25μg/ml 溴化乙锭，置于 1×TAE 缓冲液中。
6. 琼脂糖凝胶在 1×TAE 缓冲液中以 1.2V/cm 进行电泳，直至染料前段到达凝胶边缘，需过夜（通常 18h 左右）。
7. 把琼脂糖凝胶在变性缓冲液中孵育两次，每次 30min。以转化缓冲液清洗凝胶

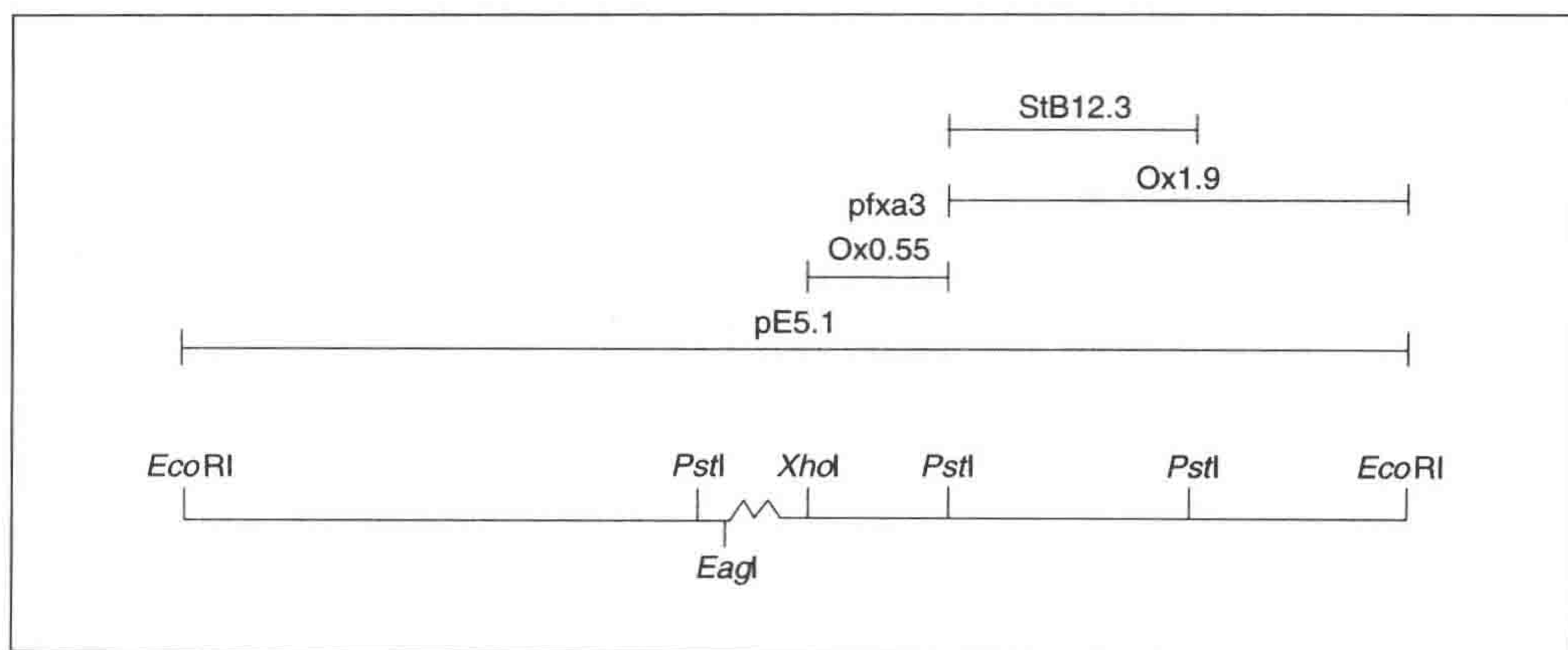


图 9.3.2 脆性 X 区域限制酶酶切图谱，图中标明了用于 Southern 杂交分析的区域探针

15min。按照生产厂商要求，用 Turboblotter Rapid Downward Transfer System 将 DNA 转至 Nytran 膜上。

8. 10～20ml 杂交缓冲液中 60℃无探针预杂交 6～18h。
9. 利用寡核苷酸标记试剂盒，将 3000Ci/mmol [α-^{32}P] dCTP 与 α-^{32}P 标记的 StB 混合至 10^6 cpm/ng 左右。通过煮沸变性约 50ng 标记探针，再置于冰上。将杂交缓冲液稀释至 5×10^6 cpm/ml 并以此代替预杂交缓冲液。以 60℃杂交 18～20h。
10. 以 100ml 2×SSPE/0.1% SDS 洗膜 5min，室温。换成 1×SSPE/0.1% SDS 室温孵育 5min。再换成 125ml 预热的 0.1% SSC/0.1% SDS 30℃孵育 60min。室温下以 2×SSPE 清洗杂交膜。
11. 将膜吸干，包入 UV 透明塑料薄膜，－70℃自显影 1～10d。

参考文献：Maddalena *et al.*，2001；Rouseeau *et al.*，1991

编者：Sarah L. Nolin，Carl Dobkin，and W. Ted Brown

单元 9.4 肌强直性肌营养不良（myotonic dystrophin，DM）的三核苷酸重复的分析

基本方案 1 PCR 扩增的 DM 三核苷酸重复的杂交分析

在本方案中，PCR 扩增用于检测 DM 的<3kb 的原突变和扩增。

注意：涉及 PCR 的操作须相当小心以避免污染。

材料（标√的条目参见附录 1）

√10mmol/L dNTP 混合物

√10×PCR 扩增缓冲液含 15mmol/L $MgCl_2$（4℃或－20℃可储存至多 6 个月）

10ng/μl PCR 引物 1a：（5′-TGGAGGATGGAACACGGACGG-3′）或引物 1b：

(5′-CAGAGCAGGGCGTCATGCACA-3′；对 Mg 敏感性稍差，但一致性较好。)

10ng/μl PCR 引物 2：(5′-GAAGGGTCCTTGTAGCCGGGAA-3′)

5U/μl *Taq* DNA 聚合酶

DNA 样品：50～500ng 纯化 gDNA，绒毛或羊水细胞的 Chelex 煮沸裂解物 (Welsh *et al.*，1991)，或 NaOH 煮沸裂解物 (Kogan *et al.*，1987)

矿物油

1.8% (*m*/*V*) 琼脂糖凝胶

√1×TBE 缓冲液

10mg/ml 溴化乙锭

√10×凝胶载样缓冲液

分子质量标记物

√预杂交/杂交缓冲液，50℃

1μmol/L 碱性磷酸酶处理的 $(CTG)_{10}$寡核苷酸

洗脱缓冲液Ⅰ：1×SSC (附录 1) /0.5% (*m*/*V*) SDS，加温至 50℃

洗脱缓冲液Ⅱ：0.25×SSC (附录 1) /0.5% (*m*/*V*) SDS，加温至 50℃

洗脱缓冲液Ⅲ：1×SSC (附录 1)，室温

Lumi-Phos 530 底物溶液 (Boehringer Mannheim，Lumigen)

0.5ml PCR 管

15cm×10cm 铸造托盘，0.75mm 厚梳齿

尼龙膜，正电 (如 Biotrans+，ICN Biomedicals)

循环温度仪 (如 Perkin Elmer 480)

喷涂器

Kodak X-AR 放射自显影胶片

1. 标记 0.5ml PCR 管，包括每个 DNA 样品及阳性对照 (已知大片段 DM 扩增的 DNA) 和阴性对照 (以水代替 DNA)。
2. 按下述给每个样品准备 PCR 反应混合物，或同时配制多个样品的总混合物，冰上保存 (按 *n*+1 配制以保证足量)：

   4μl 10mmol/L dNTP 混合物；

   2.5μl 10×PCR 扩增缓冲液含 15mmol/L $MgCl_2$；

   5μl 10ng/μl PCR 引物 1 (以引物 1b 扩增产物比引物 1a 大 64kb)；

   5μl 10ng/μl PCR 引物 2；

   7.25μl 高压灭菌水；

   0.25μl 5U/μl *Taq* DNA 聚合酶。
3. 用单独的移液枪取≤1μg (1μl) DNA 入 PCR 反应管中。必要的话，反应物上覆盖矿物油。
4. 按照以下扩增循环进行 PCR 反应 (按照 Perkin-Elmer 480 型循环温度仪优化)。

起始步骤：	96℃	3min
30 个循环：	96℃	3min

	60℃	1min
	72℃	1.5min
最终步骤：	72℃	10min

5. 在 1×TBE 缓冲液中准备 73ml 1.8%的琼脂糖凝胶（用于真空印迹者则<1%；支持方案 1）。加 10mg/ml 溴化乙锭至终浓度为 0.5μg/ml。将胶倒入 15cm×10cm 带有 0.8mm 梳齿的托盘。
6. 每个 PCR 产物取 5μl，加 10×凝胶载样染料至终浓度为 1×，上样（包括一个泳道的合适的分子质量标记物）。
7. 当溴酚蓝染料的前端离点样孔约 3.5cm 时，给凝胶照相。
8. 当溴酚蓝染料的前端离点样孔约 5.5cm、二甲苯胺离点样孔约 2cm 时，停止电泳。
9. 通过毛细管转化 CTG-PCR 产物过夜（此法转化更彻底并优化大的 DM 扩增的涂抹带的分析）或真空印迹至带正电的尼龙膜几个小时（支持方案 1）。按自选方法（即采用烘焙或 UV 交叉连接）将 DNA 固定到膜上。用钝头镊子处理膜边缘。不要留下指纹（即使戴了手套）。
10. 以预杂交/杂交缓冲液 50℃预杂交 1.5h 至过夜。
11. 弃去预杂交/杂交缓冲液。加 20μl 碱性磷酸酶处理的 $(CTG)_{10}$ 寡核苷酸至 20ml 新鲜配制的预杂交/杂交缓冲液中（探针终浓度约为 1nmol/L 左右）。50℃杂交至膜 1.5～2h。预热洗脱缓冲液Ⅰ、Ⅱ至 50℃。
12. 从预杂交/杂交缓冲液中取出膜，滤干多余液体，按以下步骤洗脱：
    洗脱缓冲液Ⅰ——洗脱两次，每次 5min，50℃；
    洗脱缓冲液Ⅱ——洗脱两次，每次 5min，50℃；
    洗脱缓冲液Ⅲ——洗脱一次，5min，室温。
13. 将膜置于干净平面，避免胶干透。在通风橱中，距离 12～18in 向膜小心喷洒 Lumi-Phos 530 底物溶液，将膜完全并均匀覆盖。
14. 以塑料薄膜或保护性醋酸纤维薄膜将杂交膜包裹，边缘切实封严，防止多余的 Lumi-Phos 530 底物溶液泄露并造成人工产物。
15. 将印迹暴露于 Kodak X-AR 放射自显影胶片，37℃ 3h 至过夜。

支持方案 1　使用真空印迹设备进行 PCR 产物的快速转移

注意：严格按照以下步骤操作以保证转移的一致性。

附加材料（基本方案；标√的条目参见附录 1）

含 PCR 产物的琼脂糖凝胶（基本方案；≤1%的凝胶效果最好）
0.5mol/L NaOH/1.5mol/L NaCl
√20×和 2×SSC
滤纸（Whatman 3MM）
真空转移装置
遮蔽胶带
80℃烤炉或 UV 交叉连接设备

1. 按照基本方案 1 第 8 步操作，在 500ml 0.5mol/L NaOH/1.5mol/L NaCl 溶液中变性含 PCR 产物的琼脂糖凝胶 10～15min。
2. 以钝头镊子处理胶的边缘，修剪成 15cm×20cm 大小。将滤纸剪成 25cm×20cm 大小，边角修圆。
3. 分离真空设备部件。将多孔渗水板粗面朝下放置，滤纸置于多孔渗水板上，用水湿润滤纸并除去气泡。在滤纸上方放置干燥尼龙膜。
4. 将衬垫置于膜的顶端上，确保衬垫覆盖真空台面的“O”形环。加少许水到过滤器以检测压力并将压力表设置为 40cm H_2O。
5. 将压力减至零并将凝胶置于衬垫的窗口。用遮蔽胶带覆盖有凝胶的孔。通过在凝胶表面转动玻棒或 10ml 移液枪枪头除去凝胶与膜之间的气泡。
6. 以少量 20×SSC 覆盖胶的表面，增加压力至 40cm H_2O。
7. 以新鲜配制的 20×SSC 注满槽孔，完全浸没凝胶，凝胶表面在液面以下 0.5～1cm。保持压力 40cm H_2O 1h。
8. 转移近结束时，保持压力，同时倒出缓冲液。关闭压力，拿出凝胶。取出尼龙膜，不要清洗。
9. 通过 80℃烘烤 15min 或 UV 交叉连接固定 DNA。以 2×SSC 清洗固定后的尼龙膜 3～5min。进行膜杂交（基本方案 1，第 10～15 步）。

支持方案 2　DM 三核苷酸重复扩增的放射性检测

以 T4 多聚核苷酸激酶进行^{32}P末端标记的（CTG)$_{10}$寡核苷酸也可进行杂交反应。

附加材料（基本方案 1）

已印迹到带正电的尼龙膜上的 PCR 产物（基本方案 1 或附加方案 1）

10ng/ml 柱纯化的［γ-^{32}P］dATP 末端标记的（CTG)$_{10}$寡核苷酸（特定放射性 10^8～10^9 cpm/μg；附录 3E）以预杂交/杂交缓冲液（附录 1）稀释至 10ng/ml。

1. 膜在预杂交/杂交缓冲液中以 50℃预杂交 1.5h。
2. 在预杂交/杂交缓冲液中，以 10ng/ml 柱纯化的［γ-^{32}P］dATP 末端标记的(CTG)$_{10}$寡核苷酸与膜 50℃杂交 2h。
3. 按照下列步骤洗脱杂交膜（放射性标记比酶学分析更经得起严格标准的考验）：
   洗脱缓冲液Ⅰ——洗脱两次，每次 5min，55℃；
   洗脱缓冲液Ⅱ——洗脱两次，每次 5min，55℃；
   洗脱缓冲液Ⅲ——洗脱一次，3～5min，55℃。
4. 室温，将膜与 X-AR 自显影胶片曝光 0.5～3h。

基本方案 2　DM 患者 gDNA 三核苷酸重复的杂交分析

gDNA 杂交分析对于确定 DM ＞250bp 的扩增特别有效。此法可用于排除 E3 至 E4 类扩增（表 9.4.1），后者通过 CTG-PCR 只有一条等位基因可见，并且 CTG-PCR 产物与（CTG)$_{10}$杂交不能检测到原突变或扩增（基本方案 1）。

注意： E3 至 E4 类扩增不能通过真空印迹有效转移。

表 9.4.1　DM 分类系统

类别	扩增特点
E0	扩增可通过 PCR 杂交检测，不能通过 gDNA 杂交检测
E1	＜0～1.5kb
E2	1.5～3.0kb
E3	3.0～4.5kb
E4	4.5～6.0kb

材料（标√的条目参见附录 1）

纯化的 gDNA

50U/μl *Eco*RⅠ限制性内切核酸酶，10×限制性内切核酸酶缓冲液

0.6%琼脂糖胶

√1×TBE 缓冲液

√10×凝胶载样缓冲液

分子质量标记物（如 λ-*Hin*dⅢ消化的 DNA）

以 1×TBE 缓冲液溶解的 1.0μg/ml 溴化乙锭

0.4mol/L NaOH

中性化溶液：0.2mol/L Tris · Cl，pH 7.5（附录 1）/ 2×SSC（附录 1）

√预杂交/杂交缓冲液

10^8～10^9 dpm/μg 柱纯化的［α-^{32}P］dCTP pGB2.2 或 p750 探针（R. Korneluk 提供，附录 3E），以随机六核苷酸引物标记并通过柱纯化

洗脱缓冲液Ⅳ：2×SSC（附录 1）/0.1%（*m/V*）SDS，室温

洗脱缓冲液Ⅴ：2×SSC（附录 1）/ 1.0%（*m/V*）SDS

20cm×20cm 铸造托盘，1.5mm 厚梳齿

带正电尼龙膜（如 Biotrans+，ICN Biomedicals）

滤纸（Whatman 3MM）

1. 以 50U（如为 DNA 自动抽提仪提取的 DNA，则可能需更多酶量并加 4mmol/L 亚精胺）*Eco*RⅠ消化纯化的 gDNA（每泳道 2～5μg）。
2. 消化 DNA 时，用不含溴化乙锭的 1×TBE 缓冲液配制 0.6%琼脂糖凝胶，将凝胶倒入插好 1.5mm 厚梳齿的 20cm×20cm 铸造托盘中。
3. 消化好的 DNA 中加入 10×凝胶载样缓冲液（终浓度为 1×），上样至凝胶，其中一个点样孔应为合适的分子质量大小标记物。
4. 在不含溴化乙锭的 1×TBE 缓冲液中以 35V、40mA 将凝胶电泳 20～22h，然后升至最大 45V、50mA 继续电泳 5～8h 直到二甲苯胺染料前端到达凝胶的底部。
5. 在 500ml 含 1.0μg/ml 溴化乙锭的 1×TBE 缓冲液中染胶 20～30min。给染好的胶拍照。
6. 凝胶在 500ml 0.4mol/L NaOH 溶液中变性 30min（对于其他种类的膜用其他方案）。

7. 在≥500ml 0.4mol/L NaOH 溶液通过毛细管转移 DNA 至带正电的尼龙膜。转移 6h 至过夜。
8. 转移后，从凝胶上取下尼龙膜，置中性化溶液中轻柔振荡，孵育 15min。
9. 将膜轻放至滤纸上吸干。通过 80℃烘烤 15min 或交叉连接固定 DNA。
10. 在预杂交/杂交缓冲液中，65℃预杂交膜≥1h。
11. 在预杂交/杂交缓冲液中，65℃下，与 10^6cpm 柱纯化的 [α-^{32}P] dCTP-pGB2.2 杂交过夜。
12. 杂交完成后，按照下述严格洗脱杂交膜：
    洗脱缓冲液Ⅳ——洗脱两次，每次 10min，室温；
    洗脱缓冲液Ⅴ——洗脱 2 或 3 次，每次 10min，65～70℃。
13. 用滤纸将膜吸干，以塑料薄膜包裹。
14. −80℃，将杂交膜与带增光屏的 X-AR 自显影胶片曝光过夜。

参考文献：Mahadeyan *et al.*，1992

编者：Linda C. Surh，Mani Mahadevan，and Robert G. Korneluk

单元 9.5　非随机 X 染色体失活的检测

基本方案　X 染色体失活的检验

注意：本检验必须使用高质量、高分子质量的 gDNA

材料：

NE 缓冲液 1（New England Biolabs）
10U/μl *Hpa*Ⅱ 限制性内切核酸酶
100ng/μl gDNA 样品（附录 3A），从外周血或口腔黏膜提取
100ng/μl gDNA 样品，已发现有高度倾斜的 X 染色体失活表现
无 RNA/DNA 酶的微量离心管
循环温度仪或水浴仪

1. 在灭菌的无 RNA/DNA 酶的微量离心管中准备下述两种反应混合液，按指示的顺序添加反应物（总体积 12.5μl）。每加一种反应物，以移液枪上下吸打保证混匀。
    反应 1：*Hpa*Ⅱ预消化反应：
    5.25μl 去离子水；
    1.25μl NE 缓冲液 1；
    1.0μl 10U/μl *Hpa*Ⅱ；
    5μl 100ng/μl 分离的 DNA 产物（500ng DNA）。
    反应 2：阴性对照（无 *Hpa*Ⅱ）：
    6.25μl 去离子水；
    1.25μl NE 缓冲液 1；

5μl 100ng/μl 分离的 DNA 产物（500ng DNA）。

2. 作为阳性对照，准备上述两种反应混合物，使用已发现有高度倾斜的 X 染色体失活表现的 DNA 进行酶切。
3. 在循环温度仪或水浴中，37℃孵育 120min。
4. 孵育终末以 65℃、30min 灭活 *Hpa* Ⅱ。4℃保存 48h 以上，或－20℃保存足够长时间。
5. 继续进行 PCR 扩增反应、染料标记，以及限制性片段的凝胶电泳（支持方案）。

支持方案　PCR 扩增和标记消化和未消化的 DNA 模板

作者和其他人已发现最精确的检测方法是以荧光分子或红外线吸收染料共价标记结合的引物。根据染料活性及配对效率确定合适的未标记引物对标记引物的稀释倍数和（或）正确的 PCR 循环数，从而在所用的检测系统中，标记的 PCR 产物量可在线性变化内。举个例子，正向引物以 LICOR IR 染料标记，PCR 循环数为 20，以 IR 测序仪检测 PCR 产物，也可用其他标记及检测方法。

注意：标记引物是光敏感的，应随时注意避光保存。

材料（标√的条目参见附录 1）

Red *Taq* DNA 聚合酶和 10×PCR 反应缓冲液
√1.25mmol/L dNTP 混合物（每种 dNTP 1.25mmol/L）
√1pmol/μl 标记的 Met-F 正向引物（引物序列见附录 1）
√5pmol/μl 未标记的 Met-R1 反向引物（引物序列见附录 1）
50ng/μl *Hpa* Ⅱ 预消化的阳性、阴性对照 DNA（基本方案）
IR2 终止液/载样染料（LI-COR）
100bp DNA 分子质量标记物（Life Technologies）
96 孔 PCR 反应板（如 Perkin-Elmer）
循环温度仪
LI-COR 4200S DNA 分析仪

1. 为每个反应准备下列母反应混合液，用于一日量（注意每个样品都是两次反应，包括阳性对照也是一样；基本方案）：
   6.0μl 去离子水；
   1.25μl 10×PCR 反应缓冲液；
   1.0μl 1.25mmol/L dNTP 混合物；
   1.0μl 1pmol/μl 标记的 Met-F 正向引物；
   0.25μl 5pmol/μl 未标记的 Met-R1 反向引物；
   1.0μl 1U/μl Red *Taq* DNA 聚合酶。
2. 在 PCR 反应板对应孔中，加入 10.5μl 母反应混合液。
3. 在基本方案中准备好的 50ng/μl *Hpa* Ⅱ 消化及阳性、阴性对照 DNA 样品 2μl 加入到 PCR 反应板对应标记的孔中。
4. 将 PCR 反应板置于循环温度仪，按下列条件进行 PCR 反应（－20℃至多保存一周）。

1 个循环：	3min	94℃（变性）
19 个循环：	30s	94℃（变性）
	30s	60℃（退火）
	45s	72℃（延伸）
最终步骤：	不确定	4℃（保存）

5. 若 PCR 产物冻存则先融化，再加 3μl IR2 终止液/载样染料至每个 12.5μl 的样品，用移液枪头上下吹打以混匀。
6. 在循环温度仪中以 93℃变性 3min，并立即置于冰上。
7. 在 LI-COR 4200S DNA Analyzer 仪器中检测样品：酶切样品与未酶切样品紧邻，而外侧泳道为分子质量标记物。按照仪器操作手册上样，以变性丙烯酰胺凝胶电泳（产物 250～300bp）检测样品。
8. 在完成的图像文件中手工标记泳道。通过确定未消化样品中两条 X 染色体的等位基因激发的两个峰之后，对每个样品的男性荷尔蒙受体等位基因的激活/未激活的相对比值进行定量。然后对任何非一致的等位基因扩增进行峰值一致化。按照消化样品的峰值比确定相乘的一致化系数。

参考文献：Allen *et al.*，1992

编者：Melissa M. Thouin，James M. Giron，and Eric P. Hoffman

单元 9.6　父子关系的分子分析

基本方案 1　通过 RFLP 技术进行 VNTR 分析

材料（标√的条目参见附录 1）

待测个体（如母亲、小孩、声称的父亲及家系外个体对照；支持方案 1）的 DNA，一般从全血分离
限制性内切核酸酶及合适的缓冲液
0.6%（*m/V*）微型琼脂糖凝胶
DNA 分子质量大小标记
20cm，0.7%～1.0%分析琼脂糖凝胶
1×TBE 缓冲液（Life Technologies）
10mg/ml 溴化乙锭（室温，避光，至多保存一年）
放射性或非同位素标记的 DNA 探针（表 9.6.1），用于 VNTR 序列确定
0.2mol/L NaOH
0.2mol/L Tris · Cl，pH7.5/2×SSC
2×SSC
尼龙膜（如 PALL Biodyne）
Whatman 3MM 滤纸

X 线胶片（如 X-Omat 胶片；Kodak）

50℃孵育器或水浴

表 9.6.1　基于 RFLP 常用的父子关系检测的探针

探针	位点	染色体位置	兼容的限制性内切核酸酶
3′HVR	D16S85	—	*Hae* Ⅲ，*Pvu* Ⅱ，*Pst* Ⅰ
CMM101	D14S13	14q	*Hae* Ⅲ，*Pst* Ⅰ
EFD52	D17S26	17q	*Hae* Ⅲ
g3	D7S22	7q36-qter	*Hinf* Ⅰ
MS31	D7S21	7p22-qter	*Hinf* Ⅰ，*Pst* Ⅰ
MS43A	D12S11	12q24.3-qter	*Pst* Ⅰ，*Hinf* Ⅰ
pAC415	D7S467	7q	*Hae* Ⅲ，*Pst* Ⅰ
pAC424	D6S132	6q27	*Hae* Ⅲ，Hinf Ⅰ，*Pst* Ⅰ
pAC425	D1S339	1p36	*Hae* Ⅲ，*Hinf* Ⅰ，*Pst* Ⅰ
pH30	D4S139	4q35	Hae Ⅲ
pL336	D1S47	—	*Pst* Ⅰ，*Hae* Ⅲ
pL427-4	D21S112	—	*Pst* Ⅰ
TBQ7	D10S28	10pter-p13	*Hae* Ⅲ，*Pvu* Ⅱ
V1	D17S79	—	*Hae* Ⅲ，*Pst* Ⅰ
YNH24	D2S44	2p	*Hae* Ⅲ，*Pst* Ⅰ，*Hinf* Ⅰ

1. 选择合适的限制性内切核酸酶完全消化 1μg DNA 样品。严格按照生产商要求设定酶切条件（注意星活性）。
2. 将每个酶切的 DNA 样品及酶切和未酶切的对照 1μl 载样至 0.6%（*m*/*V*）微型琼脂糖凝胶，按照附加方案 1 第 9～10 步进行电泳并照相。如果酶切不完全，增加酶量并延长酶切时间。
3. 将 DNA 分子质量标记物、母亲样品、小孩样品、声称的父亲样品和家系外个体对照样品载样至 1×TBE 缓冲液浸泡的 20cm，0.7%～1.0%分析琼脂糖凝胶。将 DNA 分子质量标记物载样至第一个和最后一个点样孔（或紧靠第一个和最后一个样品）。
4. 以 40V 电泳过夜或直至溴酚蓝染料迁移至凝胶的边缘，电泳缓冲液可回收使用。
5. 以溴化乙锭染胶并照相（尽量减少 UV 暴露）以记录 DNA 消化、迁移距离及 DNA 浓度对比情况（支持方案 1，第 9～10 步）。
6. 通过毛细转移将 DNA 从凝胶转移至尼龙膜，使用标准 Southern 印迹技术进行电印迹或真空印迹（附录 3G）。
7. 按照标准方案进行探针与膜的杂交。每毫升杂交溶液使用 2×10^5 cpm 探针。
8. 根据探针，以严格条件洗脱印迹（附录 3G）。
9. 倒掉最终洗脱液，用 Whatman 3MM 滤纸吸去膜上多余的液体。用塑料薄膜包裹膜，与 X 线胶片曝光（如采取夹心三明治的方式），放射性探针曝光 12～48h，非放射性的时间稍短。

10. 一旦自显影形成，在 350ml 50℃的 0.2mol/L NaOH 溶液中，持续轻柔振荡，洗涤杂交膜 30min 以使探针条带显现。倒除 NaOH 重复洗涤一次。室温下，用 350ml 0.2mol/L Tris · Cl，pH7.5/2×SSC 溶液，持续轻柔振荡清洗印迹约 30min。再以约 300ml 2×SSC 溶液简单清洗。重复进行另外一个位点探针的杂交或干燥膜，以塑料薄膜包裹，室温保存至多 5 年。
11. 在给胶片标记上样品名称前，仔细检查自显影像的质量及合适条带的强度。
12. 确定条带的分子质量大小（如采用 DNAVIEW 时会自动调用 Numonics digitizer）。如果使用了两种不同的方法确认条带分子质量大小，比较不同的读值以确定其准确性，取平均值。每次均须确认家系外个体对照的条带大小。

基本方案 2　PCR 分析多态位点

尽管基于 Southern 的 RFLP 检测是一种很有效的、近乎艺术级的确定生物学关系的手段，但 PCR 技术在常规的父子关系的检测中越来越常用。商业化的用于多态区间扩增的试剂盒包含了使用生产商预制的酶溶液、各种缓冲液和引物的方案，以及它们对 DNA 浓度、时间和 PCR 扩增循环次数的建议；然而需要特别指出的是不同位点的扩增可能需要对一般的扩增条件做一定的修订，这由进行此项工作的实验室自行决定。PCR 分析的所有方案以 gDNA 开始，因此，如果 RFLP 分析要与 PCR 一同进行的话，在进行限制性酶切之前（基本方案 1，第 1 步）需要把起始生物学样品各自分开，备 PCR 分析用的样品留待扩增使用。

表 9.6.2 为通过 RFLP 与 PCR 方法进行父子关系检测的比较。

表 9.6.2　父子关系检测，RFLP 与 PCR 方法的比较

RFLP	PCR
1990 年以来常规用于父子关系检测	较新的技术，少数一些父子关系检测的实验室使用
需要少量样品（0.1～0.5ml 全血对应的 DNA 量）	需要微量样品（<0.1ml 全血对应的 DNA 量），适于低样品量情况
需要高分子质量 DNA	降解样品也可分析
实际检测操作时间一周左右	比 RFLP 检测时间更短（如 2～3d）
特征性 DNA 片段需要分离、分子质量大小确定、结果一目了然	DNA 片段分离、分析前可形成多拷贝的特征性片段
用于父子关系检测，相对来说其操作标准、操作指导建立已久，检测结果得到一般法庭的承认	用于父子关系检测，操作标准、操作指导近期才建立，较少的法庭采用其结果
区别度高，可排除大量错误被指控者或可得到高的父子关系概率	特征性片段的多态性稍差，对于确定关系帮助较小，为达到标准需要增加更多的位点

ASO 探针

最常用的基于 ASO 的系统是已商业化的 AmpliType PM + DQA1 PCR Amplification and Typing 试剂盒，其包含所有的实验指导，以及扩增和分型 6 个独立位点需要

的反应组分（表 9.6.3)。

表 9.6.3　PCR 方法检测父子关系中常用的等位基因特异性寡核苷酸探针的排除率

系统	染色体位置	平均排除率
LDLR	19p13.1-13.3	0.087～0.239
GYPA	4q28-31	0.120～0.190
HBGG	11p15.5	0.181～0.274
D7S8	7q22-31.1	0.161～0.237
Gc	4q11-13	0.132～0.298
DQA1（DQα）	6P21.3	0.476～0.575

序列特异性探针条带在父子关系检测中并不常使用，主要在于其相对低的排除率及购买试剂盒费用较高。但其在法医学个体确认中仍然有用，此时需要匹配整个遗传物质的遗传方式而不是单个等位基因，得到的是不同的统计学数据。对 3 个不同个体以及阴性、阳性对照个体的多位点标记物分析的结果如表 9.6.4 所示。

表 9.6.4　三个个体的多位点分型

个体	LDLR	GYPA	HBGG	D7S8	Gc
A	B	A、B	A、B	A、B	A、B
B	B	A	B	A	A、C
C	B	A	B	A、B	A、C
阴性对照	—	—	—	—	—
阳性对照	B	A、B	A	A	B

扩增片段长度多态性（amplified fragment length polymorphism，AmpFLP）

特定的引物与每个待检个体的非消化 gDNA 特异结合扩增，根据其中重复片段的大小不同可将 AmpFLP 分为两类。长串联重复片段（long tandom repeat，LTR）和短串联重复片段（Short tandom repeats，STR）都有可变数目的重复片段，均可通过 PCR 进行分析。

长串联重复

LTR 的重复片段大小在 10～80bp，其等位基因大小在 300～1000bp，杂合度在 95%左右。

短串联重复

在个体确认的检测中所用的 STR 大多是 4bp 的重复单位，等位基因大小在 100～350bp，杂合度一般在 65%～85%。表 9.6.5 列出了一些常用的 STR。更多此类位点的信息可以访问：http：//www. promega. com/tbs/tmd008/tmd008. html。

表 9.6.5 PCR 检测方法中常用的短串联重复（short tandom repeat，STR）位点

STR	染色体位点	确定的基因	K562 等位基因方式[a]
CSF1P0	5q33.3-34	CSF-1 受体原癌基因	10，9
TH01	11p15.5	酪氨酸羟化酶	9.3，—
TP0X	2p23-2pter	甲状腺过氧化物酶	9，8
vWA	12p-12pter	Von Willebrand 抗原	16，16
LPL	8p22	脂蛋白脂酶	12，10
F13A01	6p24-25	凝集因子Ⅻ亚单位 a	5，4
F13B	1q31-q32.1	凝集因子Ⅻ亚单位 b	10，—
D16S539	16q24-16qter	NA[b]	12，11
D7S820	7q	NA[b]	11，9
D13S317	13q22-q31	NA[b]	8，—
D5S818	5q21-31	NA[b]	12，11
FES/FPS	15q25-qter	c-fes/fps 原癌基因	12，10

a. 每个位点的重复次数。短横线为习惯性表示，即该位点只能检测到一个等位基因，可能是也可能不是纯合状态；

b. NA＝不能确定（not available）。

电泳和检测

手动系统

在手动系统中，尽管有一些高分辨率的琼脂糖凝胶可用，但 PCR 产物最常用聚丙烯酰胺凝胶电泳，如 MetaPhor 和 NuSieve（FMC BioProducts）。准确的条件取决于要分离产物的大小和给定的溶液条件（如附录 3F、CPMB 单元 2.5A 或 Sambrook *et al.*，1989）。

半自动系统

LTR 和 STR 的 PCR 产物也可通过半自动系统进行分离、检测和分析。该系统包括基于凝胶的、整合电泳、检测和分析于一个功能单元（PCR 片段必须是荧光标记的）和荧光显像系统。

自动系统

在著此书时，用于 LTR 和 STR 分析的唯一完全自动的系统就是通过毛细管电泳（capillary electrophoresis，CE）。正如其名称所暗示的，电泳是在毛细管而不是在玻璃板之间进行。CE 的缺点在于目前只有单毛细管系统可用，所以一次只能进行一个样品的分析。尽管如此，因为 CE 可在一个比常规高出许多的电压下进行，其可在 20min 左右的时间内完成片段的分离，这可以弥补其通量有限的缺点。

支持方案 1　全血 gDNA 的制备

材料（标√的条目参见附录 1）

待检个体的全血样本（如母亲、小孩、声称的父亲及家系外个体对照）

√细胞休克溶液

√核裂解缓冲液

√10%（m/V）SDS

20mg/ml 蛋白酶 K（Boehringer Mannheim）

饱和 NaCl 溶液

100%和70%乙醇，室温

√TE 缓冲液，pH7.5

0.6%（m/V）微型琼脂糖凝胶

标准 DNA 浓度溶液

10mg/ml 溴化乙锭（室温，避光，至多保存一年）

EDTA Vacutainer 管（紫色顶盖）

56℃孵育仪或水浴

1. 使用标准静脉采血技术采集每个待检个体的血样（最少250μl）至EDTA抗凝的Vacutainer管（紫色顶盖）。以合适的可确定身份的信息标记每管，信息包括姓名、抽血日期及其他信息（如输血、骨髓移植等病史）。
2. 每个血样加250～500μl至标记好的微量离心管。－70℃冰冻样品至少1h以裂解红细胞。如需要，微量离心管可在－70℃保存数年。剩余在Vacutainer管中的血样在4℃可保存数月。
3. 每个样品解冻至室温，以约10 000g 室温离心1min。除去上清，留下含有核细胞的约100μl溶液，加900μl细胞休克溶液。反复倒置混匀7～10min直至细胞完全裂解。10 000g 室温离心1min。除去上清。
4. 加300μl核裂解液至管底的斑块，以移液枪轻柔打匀。加20μl 10% SDS，10μl 20mg/ml蛋白酶K。轻柔倒置混匀，56℃孵育2h至过夜。
5. 加100μl饱和NaCl溶液。激烈振荡15s。静置5min，10 000g 室温离心4min。将含DNA的上清液400μl左右转移至干净的、标记好的微量离心管中。
6. 加2倍体积的室温的100%乙醇。倒置混合，直至DNA沉淀。5000g 室温离心1min，除去上清。
7. 70%乙醇清洗DNA斑块以除去残留的盐。以移液枪将500μl 70%乙醇轻柔注于斑块上，轻柔倒置离心管。按上述离心1min，以1%动力开始，逐步增加速度至100%动力（10 000g）。以移液枪吸去乙醇。重复清洗。斑块风干约5min，或直至斑块边缘开始透明。
8. 根据每个DNA斑块大小以20～80μl TE缓冲液（pH7.5）重悬。定期轻柔振荡，56℃孵育2h。
9. 每个DNA样品取1μl至0.6%（m/V）微型琼脂糖凝胶，包括标准DNA浓度溶液。7V/cm电泳至溴酚蓝迁移至凝胶的3/4长度。在含10μl 10mg/ml溴化乙锭的50ml水中轻柔振荡染色10～30min。如需要，染色后凝胶置于清水中15min，两次，以降低背景。
10. 通过凝胶判断DNA的状态及质量。比较待测样品DNA与已知浓度的标准品的浓度（500μl全血一般可得到3～10μg DNA）。

支持方案 2　母亲及声称父亲的 DNA 图谱数据的阐述、统计学估算和报告

下列程序概述了同时具有母亲和声称的父亲双方的样品时，对单位点 DNA 图的阐述和估计以确定亲子关系。

1. 比较小孩和其母亲及声称的父亲的 DNA 条带大小。如果属于亲本的条带不在分辨阈值（delta，即分子质量百分值，各实验室可自行确定，如约 2.5%条带大小）范围内，则认为他们不相匹配。
2. 对于每个检测的 DNA 探针，在该位点确定其声称父亲是否可被排除。对于一个给定的探针，如果孩子的父源条带（即该条带与母源条带不符）与声称父亲的条带相符，则在该位点不能排除声称父亲为生物学父亲（详细的可能非排除性方式列表可参见 Morris *et al.*，1989）。如果孩子的父源条带不与任何声称父亲的条带相符，则可在该位点排除此声称父亲。
3. 所有检测探针的信息分析完毕后，按照下列方针判断是否排除声称父亲为生物学父亲。

   a. 最少可由两个探针组成一个父子排除。按照第 7 步准备父权报告。

   b. 如果两个探针不能排除声称父亲，则按第 4～6 步进行父权数据的统计学分析。
4. 对于每个声称父亲不能排除的探针，按以下公式计算父子指数（即声称父亲生育给定基因型后代的可能性与同种族随机非相关个体生育该后代可能性的比值）：

   $$\mathrm{PI}=X/Y$$

   这里 X 代表母亲与声称父亲婚配生育孩子基因型的可能性（即孩子从母亲和父亲获得相应遗传片段的频率的结果）；Y 则是母亲与声称父亲同种族随机非相关个体婚配生育孩子基因型的可能性（即孩子从母亲和声称父亲同种族随机非相关个体获得相应遗传片段的频率的结果）。

   DNAVIEW 通过精确的协同电泳模式，将孩子父源等位基因的人群频率整合到 Y 值当中（Brenner and Morris，1989）。该计算方法整合了一个 sigma 值，该值以分子质量的百分值来估计不精确测量的量。该值必须由每个实验室确定。典型的范围为 0.4%～1.2%。关于获得等位基因频率的替代方法见单元 14.4。
5. 计算联合父权指数（$\mathrm{PI}_{\mathrm{combined}}$），该值由单个探针的 PI 值得出。
6. 基于第 5 步中的联合 PI 值计算父系值概率（W）。

   $$\mathrm{W}=\frac{p\times \mathrm{PI}_{\mathrm{combined}}}{p\times \mathrm{PI}_{\mathrm{combined}}+1-p}$$

   这里的 p 是先验概率，一般给定中间值 0.5（对先验概率的讨论见支持方案 3）。
7. 在印有实验室标示的信笺上完成书面报告。每个标准的父系报告应包括以下信息：

   被检者的姓名；

   被检者的关系；

   母亲与声称父亲的种族；

   报告日期；

   实验室编号；

RFLP 方法：检测位点名称、探针名称、所使用的限制性内切核酸酶；
PCR 方法：每个扩增的 DNA 位点名称、所使用的引物对的名称或来源；
每个被检者条带大小的结果；
排除：如果声称父亲被排除为生物学父亲，则应指明不相符事实；
非排除：如果声称父亲不能排除为生物学父亲，则需指明单个 PI 值、联合 PI 值、使用的先验概率及父权概率；
实验室主任签名。

支持方案 3　特殊父权关系个案的 DNA 图谱的阐述、统计学估算和报告

尽管绝大多数情况下父子关系鉴定会包括母亲、小孩和声称父亲，但仍有部分情况孩子的一个或两个家长无法进行检测（即家系研究或亲属关系研究）。另外，也存在其他有关生物学关系的疑问（如孪生接合性、同胞关系、可能的乱伦关系）。这些问题可以通过 VNTR DNA 分型解决。

商业化的计算机程序已用于家系研究的遗传信息分析（如 DNAVIEW，Traver Paternity Software）。通过输入关系假设、备选假设（即同卵双生对异卵双生）和每个个体的基因型，程序将生成一个代数公式，该公式描述关系假设的可能性（概率）对备选假设的可能性。

缺乏母亲样品情况

当被检测的男性个体与小孩相符而母亲未检测，则 PI 值减去因子 2。当声称父亲为杂合子并与未检测母亲为同一种族时，父权指数按 $PI=1/4q$ 计算，这里 q 定义为在男性个体种群中一个随机样本中找到同一等位基因（Q）的可能性。通常 q 值是此种群中该等位基因的精确频率。如果声称父亲是纯合子，则 $PI=1/2q$。如果声称父亲和孩子都是纯合子，$PI=1/q$。

如果未检测的母亲与声称父亲的种族不同，则不能按上述将方程式简化，必须整合孩子的两个种群来源的等位基因（Traver，1996）。

当没有检测母亲，务必注意声称父亲与母亲没有密切的亲缘关系。如果母亲未检测而声称父亲是其亲属，则声称父亲有可能会被错误地认定为孩子的生物学父亲，他与孩子相同的特征性片段实际上都来自孩子母亲。

缺乏父亲样品情况

如果声称父亲不能做检测，则他各个明确关系的生物学亲属可代替他进行检测，推算可能性比值或亲属关系指数（relationship index，RI）；尽管如此，必须明确 RI 描述的是孩子和检测个体之间的可能关系而不是和未检测的男性间的直接关系。

在选择检测个体时，必须保证检测个体与未检测的声称父亲之间确切的生物学关系。当检测声称父亲的男性亲属时也要相当谨慎，以排除他们是可能的声称父亲。

检测声称父源祖父母

祖父母与孩子共有的肯定的父源等位基因数目（obligate paternal alleles，OPA）可与 RI 值整合，简化为公式：RI＝祖父母的 OPA 数值/$4q$。

检测声称父源祖父母之一

此类型的检测只能通过上述的计数声称祖父（母）的可能 OPA（0、1 或 2），再加上 $2q$。有必要考虑未检测的声称祖父（母）具有相同 OPA 的可能。因此数字化的结果要再除以 4。如果检测的声称祖父（母）为杂合子并具有 OPA，则公式为 RI＝1/2＋1/$2q$。如果检测的声称祖父（母）不具有 OPA，则公式为 RI＝0.5。

检测声称父亲的所有同胞

通过检测一定数量声称父亲所有同胞可以重建声称祖父母的基因型。当检测一个同胞时，四个祖父母的等位基因只确定了两个。如果这个同胞是纯合子并与孩子有相同的等位基因，则关系方程式为 RI＝1/2＋1/$2q$。如果声称父亲的同胞是杂合子，与孩子有相同的 OPA，则 RI＝1/2＋1/$4q$。如果孩子与声称父亲的同胞没有共同的特征性片段，则关系指数为 0.5。

孪生子分型

根据 Brenner（1997），当双毛子为杂合时用来评估遗传学证据的公式为 RI＝(1＋p＋q＋2pq)/4，p 和 q 为总览中两条条带的频率。如果同一总览与一条条带的频率是纯合的公式变为 RI＝$(1+q)^2/4$。

如何确定具有亲属关系的待确认父亲的亲子关系

如果待确定父亲不能被确定为生物学父亲，并且很可能待确认父亲的某个近亲也有可能是孩子的父亲，则该亲属也应被检测。如果无法检测该父亲，可以使用下列等式来确定该未检亲属与这名孩子的亲子关系的可能性。

如果这名孩子带有一个与其待确认父亲相同的等位基因，且该父亲是个杂合体，那么遗传学上，该待确认父亲比其兄弟、父亲、儿子更可能成为这名孩子的父亲的概率是 RI＝$2/(1+2q)$。如果在此相同的等位基因上，待确认父亲是纯合体，则该概率变为 RI＝$2/(1+q)$。

单个排除

由于 VNTR 探针检测系统的突变率很低，但非不存在亲子关系的排除，不能仅依靠单个 DNA，除非在这些血缘亲密的备选父亲中，一人被一个测试排除而另一人未被排除。一旦在大范围测试后只有一个测试显示排除，那么可得出以下三个结论之一。

1. 待确认父亲不是孩子的生物学父亲，其检测出与孩子的亲缘片段完全是偶然，这种情况很罕见，其概率完全取决于该等位基因在人群中的频率。

2. 待确认父亲不是孩子的生物学父亲，但与孩子有血缘关系，如果孩子的母亲与

待确认父亲的近亲（如兄弟、父亲或儿子）曾有交往，这些人应该接受亲子鉴定。

3. 待确认父亲确实是孩子的生物学父亲，其因单个检测被排除是由于精子细胞或孩子早期发育中的突变所致。

如果待确认父亲的任何亲属都未检测出与孩子的亲子关系，那么应该发出一份无法排除亲子关系的报告，并附有可能的说明。

尽管各人种之间的突变率应该一致，特定位点的父源和母源突变率可能有显著差异，为了计算单个差异系统的 PI 需要使用突变率 μ，PI 到计量单位是 μ。ARE 值是可由实验得出，或经如下计算得出：$ARE=h^2(1-2hH^2)$，式中 H 是检测系统的杂合性 $(1-h)$（Garber and Morris，1983；Brenner and Morris，1989；Endean，1989）。差异系统的平均 PI 由下式得出：$PI=\mu/ARE$。表 9.6.6 列出了父源突变率、ARE 和几种人类 DNA 常用探针经 *Hae* Ⅲ酶切后的 PI。

表 9.6.6　通常使用的单座位探针的父源突变比例、ARE 和突变值 PI

探针/位点	比率/μ	ARE[b]	突变值 PI
PYNH24/D2S44	0.0015	0.909	0.00165
PCMM101/D14S13	0.0018	0.928	0.00194
TBQ7/D10S28	0.0009	0.929	0.00097
EFD52/D17S26	0.0036	0.894	0.00403
pH30/D4S139	0.0071	0.867	0.00819
pAC415/D7S467	0.0008	0.872	0.00092
pAC424/D6S132	0.0002	0.785	0.00025
pAC425/D1S339	0.0050	0.785	0.00637

a. 值通过用 *Hae*Ⅲ消化人类 DNA 获得。

b. ARE 利用黑人、高加索人、西班牙人和亚洲人的数据库的平均杂合值计算得出。

突变值 PI 可与保留的非排他性系统结合来得到如支持方案 2 所描述的全面的结果。在累积的 PI 中可能需要其他测试进行向下调整。其余的测试可能有机会去发现第二个结论，当检测的人是生物学父亲的亲属时，这个结论应该是存在的。

参考文献：AABB，1997；Parentage Testing Accreditation Requirements Manual，1995；Allen *et al*.，1990

编者：Amanda C. Sozer，Charles M. Kelly，and Daniel B. Demers

单元 9.7　点突变不易扩增突变系统（简称 ARMS）分析

ARMS 技术建立在观察所给的 DNA 序列的附属寡核苷酸链上，除了一个在适当的条件下作为 PCR 引物没有功能的错配的 3′端，由于 ARMS 检测的可靠性，当在非目的等位基因中尽量减少错误的引物时就有必要确定一个将产生可检测的等位基因的 ARMS 产物的联合的引物序列和反应条件。

以下操作被用来设计 ARMS 引物以检测被用于反应条件时的点突变（基本方案）。图 9.7.1 已给出例子。

	正常序列	突变序列
正常引物	← C C AGATAG...5′ 5′...GAACGCTCTATCGCGAT...3′ 482	X C C AGATAG...5′ 5′...GAACACTCTATCGCGAT...3′ 482
突变引物	X T C AGATAG...5′ 5′...GAACGCTCTATCGCGAT...3′ 482	← T C AGATAG...5′ 5′...GAACACTCTATCGCGAT...3′ 482

图 9.7.1　单个 ARMS 检测的 ARMS 引物序列。含 CFTR 基因的 R117H 突变的 ARMS 引物序列和目的 DNA 序列（G→A 在 482 位；Dean *et al.*，1990）碱基改变提示改变位于正常和突变 DNA 序列。箭头表示引物/目的联合序列能由 *Taq* DNA 聚合酶扩增，“X”表示没有扩增。ARMS 引物里的碱基没有和目的序列互补说明目的序列被置换，单个的错配（此例中为 C/C）在次级碱基中还不足以阻止延伸。由于两个邻近错配的引物在终端和次级碱基没有扩增。

1. ARMS 引物应有 30 或更多个碱基不应小于 28 个碱基，而应小于 60 个碱基。
2. 具体的 ARSM 突变引物的 3′端碱基应符合突变序列；具体的正常引物的 3′端碱基应符合正常序列。
3. 另外需考虑到要说明错配在 ARMS 引物的次级碱基中应增强 ARMS 反应的特殊性，因为不同的错配应该会有不同的不稳定影响，因而有必要考虑终端和起始端的错配，如含突变末端的错配很明显，可以选择另外一个较弱势的错配，错配和反配被标明在表 9.7.1 中。
4. 剩余的 ARMS 引物序列应完全与目的序列互补。
5. 一般的引物设计是简洁的，引物应有 30 个碱基；需含约 50% G+C，无与 ARMS 引物 3′的互补性或与内部对照引物无引物 3′的互补性，也没有重复或异常序列（如单个碱基和回文序列产生）；也应有 150～250bp 的 PCR 产物。

注：高质量水应用于所有反应体系。可使用 Sigma 双重处理组织培养水。

表 9.7.1　ARMS 引物增加错配的选择[a]

末端错配	编码核苷酸链与引物次末端的核苷酸相符			
	A	G	C	T
AA	A	G	A	G
AG	C	T	A	G
AC	G	A	C	T
TT	C	T	A	G
TG	G	A	T	C 或 T
TC	C	T	A	G
CC	C	T	A	G
GG	A	G	A	G

a. 表格中显示的碱基包括在 ARMS 引物中的次末端位置的碱基，左栏列出 3′端具体的错配项（如含有反编码链的正常碱基的编码链的突变）顶端一行指出编码链中目的碱基符合引物次末端碱基。

基本方案　ARMS 试验检测单个突变

材料（标√的条目参见附录 1）

50μmol/L 正常 ARMS 引物
50μmol/L 突变 ARMS 引物
50μmol/L 共同（普通）引物
√50μmol/L 每对引物 A 和 B（或其他合适的引物对）
√1mmol/L 4dNTP
√10×PCR 反应缓冲液含有 12mmol/L $MgCl_2$
控制已知基因型 DNA 模板（10～50ng/μl）
轻矿物油
5U/μl *Taq* DNA 聚合酶（Perkin-Elmer Cetus Ampli Taq 或等量无 3′→5′外切核酸酶活性的酶）
√1×TBE 缓冲液 含 0.5μg/μl 乙啡啶溴化物
√loading 缓冲液
DNA 分子大小标记
检测 DNA 样本（10～50ng/μl；支持方案）
Perkin-Elmer Cetus thermal cyler（480 或 TC）和合适的反应管

1. 根据已介绍的 ARMS 引物指导栏，设计正常的、突变的和共同的 ARMS 引物以适合相应的突变。选择一个合适的参照引物，由此获得所有的引物并准备 50μmol/L 的各种溶液。
2. 根据表 9.7.2 的指导方法准备正常和突变的 ARMS 反应体系，配 40μl 预先混匀的反应体系至反应管中用于一个循环，如有必要可在室温放置几天或－20℃冻存几个月。

表 9.7.2　ARMS 混合反应[a]

试剂	正常 ARMS 反应（N）	突变 ARMS 反应（M）
50μmol/L 共同引物	10μl	10μl
50μmol/L 正常 ARMS 引物	10μl	—
50μmol/L 突变 ARMS 引物	—	10μl
50μmol/L 对照引物 A	10μl	10μl
50μmol/L 对照引物 B	10μl	10μl
1mmol/L 4dNTP 混合液	50μl	50μl
10×PCR 扩增缓冲液	50μl	50μl
H_2O	260μl	260μl

a. 所配体积可用于 10 次 ARMS 反应。

3. 室温下加 5μl 已准备好的 10～50ng/μl 对照 DNA 至每含有 N 和 M 混合引物的管中。如有可能，分别建立含正常、杂合、纯合个体的 DNA 作对照，包括一个没有加 DNA 的含 N 和 M 管的空白对照。
4. 加一滴石蜡油至每管中并盖紧，10s 高速离心。

5. 加 12.5μl 10×PCR 反应缓冲液以稀释 *Taq* DNA 聚合酶并加 5μl *Taq* DNA 聚合酶（5U/μl 为最终浓度）至 107.5μl 无菌水中（足够 10 次检测），用移液枪混匀。
6. 将 PCR 管放置热循环孔中，94℃孵育 5min 后，以最短时间拿走并移至另一管中并加 5μl *Taq* DNA 聚合酶，稀释至低浓度并覆有一层石蜡油，再放回 94℃空白孔中。重复此步骤，直至酶加入所有管中。
7. 停止 94℃程序并立即运行以下扩增程序：

35 个循环：	1min	94℃（变性）
	1min	60℃（退火）
	1min	72℃（延伸）
1 个循环	10min	72℃（延伸）

室温保存一周。

如使用 PaKin-Elmer Cetus 9600 进行快速热循环，其制造者要求改变循环次数以适合这类型机器的特点。

在扩增程序完成后，建议停止反应后应使孔中温度降至 50℃以防止人为产物产生。

8. 准备 3%琼脂糖胶使用 4.5g Nusieve：agarose 3：1 的比例，和 1×TBE 含 0.5μg/μl 乙啡啶溴化物缓冲液 150ml（足够 10 次反应）。
9. 标记一个 0.5ml 微型离心管，另加 10μl 上样缓冲液至每管。
10. 最好在无盖管在有蒸汽罩或隔离的实验室，以避免含有 ARMS 产物悬浮微粒，从石油油层下吸取 25μl ARMS 反应物至相对应的标记好的管中，并用移液枪混匀。
11. 每个胶泳道点样 20μl 产物，包括 DNA 分子标记，电泳时间为 1～2h，电压 120V；紫外线下照射成像。
12. 按照引物（A 和 B、C 和 D 或 E 和 F），分析每个泳道的预期大小及 ARMS 片段（对照片段大小分别应为 360bp、813bp 或 825bp）。正常和突变的 ARMS 产物有 3 个可能的结果：

    所期待的结果。目的等位基因存在于样本中时，没有可见产物则目的等位基因缺失。

    非特异性结果。ARMS 有产物，目的等位基因存在于样本中；当目的等位基因缺失时，ARMS 产物仍可见。

    非敏感性结果。ARMS 产物缺失或即使目的基因存在也很微弱；等位基因缺失时没有可看见的产物。

    a. 如果从正常和突变的 ARMS 引物中可获得期待的结果，那么优化条件已完成。ARMS 检测即可准备使用——省去第 13～14 步进行第 15 步。
    b. 如果有一个或两个 ARMS 引物是非特异性的，则进行第 13a 步。
    c. 如果有一个或两个 ARMS 引物是非敏感的，则进行第 13b 步。

对于非特异性的 ARMS 引物

13a. 增强反应特异性，用两套反应体系重复方案中第 2 步，分别用 2～5 倍。

14a. 如非特异性条带仍可观察到，在此末端碱基中增加错配的长度（表 9.7.3）重复第 1 步。

表 9.7.3　ARMS 引物错配长度[a]

不稳定长度	错配对
最小	GA、CT、TT
明显	CC
中等	AA、GG
弱	CA、GT
无	AT、GC

a. 错配根据不稳定的长度分类，每个碱基至少有两种错配长度不能避免。

对于非敏感性的 ARMS 引物

13b. 用两套反应体系重复第 2 步增强敏感度，在两种反应混合物中分别用 2～4 倍 ARMS 引物数量或减少对照引物浓度。

14b. 如所期待的 ARMS 产物条带仍然很弱或缺失，在此末端碱基中减少错配长度，根据表 9.7.3 重复第 1 步。

在特异和敏感的 ARMS 反应中改变一条 ARMS 引物中额外的错配常引起一个大的改变，改变引物浓度有小的影响并可优化反应。

随后使用已知基因型 DNA 样本优化 ARMS 试验，要求先配制大批量的 ARMS 反应体系，再分装，各自的 ARMS 反应体系能稳定保存在−20℃至少 6 个月。

15. 实验操作中优化的反应条件中所获得的信息去分析 DNA 样本；样品来自第 2～12 步。如有可能，包括两个空白（无 DNA）和对照（已知基因型）样本，如果发生问题，则参考表 9.7.4。

表 9.7.4　问题指导

问题	可能的原因	解决方法
在所有反应中 ARMS 和空白对照条带扩增失败有(或)无缺失	酶失活 反应省略了一些成分	使用新的 *Taq* DNA 聚合酶 重新准备 ARMS 反应体系
在所有反应中 ARMS 条带扩增失败有(或)无缺失	高比例的 G+C 使 ARMS 产物变性失败	增高变性温度至 96℃
	ARMS 检测不敏感样本	加 10%的甘油混合增加引物浓度,降低不匹配强度
在某些引物扩增中 ARMS 和对照条带扩增失败有(或)无缺失	样本 PCR 的抑制 样本 DNA 不足	1∶100 稀释样本 加 10 倍的样本量
ARMS 条带在某些反应中缺失	对照扩增反应太好	减少对照引物的浓度
对照带中出现另外的和 ARMS 产物大小一样的条带	污染 酶过剩 ARMS 检测非特异性	检查空白对照 核对酶的稀释量 减少引物浓度,增长错配的长度
ARMS 产物有另外的不同大小条带	酶过剩 人为的冷却 基因组中存在假基因引物	核对酶浓度的稀释量 在室温中冷却反应管 证实引物的特异性

续表

问题	可能的原因	解决方法
在一些泳道中 PCR 产生 50～60bp 的条纹	DNA 过剩 引物二聚体	减少 DNA 量 确保开始时的热度，核对 3′端引物的互补性
电泳胶第一泳道特别浓的条带；而后的泳道有微量的条带	酶混合不均	混匀

备选方案　多种 ARMS 致多重突变的分析

常有必要分析一个特别的基因的几种不同突变点的存在或缺失，一个选择则将实施一系列单个 ARMS 检测；在这个流程中可选择的方法将再进行多重 ARMS 检测。

单个 ARMS 检测中大多数变量被标准化，并且引物序列和浓度改变以获得期望的结果这种方法同单个 ARMS 检测相同。原则的区别是有几对混合引物同时被优化，增加了程序的复杂性。从增加的复杂性看来，在多重 ARMS 检测的发展中不可能概括同水平的程序。在单一检测的发展上程序的基本步骤是一样的，但也有以下的不同。

1. 一般，相较于单一的 ARMS 检测，在多重 ARMS 检测中使用不稳定的错配对较少，用表 9.7.1（错配对的选择）及表 9.7.3（错配长度）以选择较少的不稳定错配。
2. 在反应中不同的 ARMS 产物是有基本大小差别的。最好设计 ARMS 产物大小有≥50bp的差别。在相同的实验中有必要使用一个 PCR 扩增较大片段产物的对照；在寡核苷酸链引物中列出可选择的两个程序（参见附录中对照引物配方）。
3. 合并几种 ARMS 反应成两重反应体系。除去正常和突变的反应，则两个多重反应包含一些反应体系和其他突变的 ARMS 引物和正常 ARMS 引物。
4. 用于检测常染色体的隐性遗传疾病基因，如果同时分析至少四种突变并且两个反应管包含至少两个正常特异性的 ARMS 反应，则 PCR 对照反应能省去。
5. 如果多重检测是在同样的外显子相邻位置的几个突变时，则有可能使用许多 ARMS 引物中的单一的共同引物。
6. 多重程序和单一的 ARMS 检测一样很重要，除了或许有必要重复全过程（第 1～15 步），因为同时要优化几个扩增的反应体系。

支持方案　口腔和血液样本中 DNA 的快速提取法

以下的步骤描述一种口腔和血液样本中 DNA 的快速提取法以提供适合这个单元里描述的 ARMS 反应条件的 DNA。

材料（标√的条目参见附录 1）

170mmol/L 依酚氯铵（现配）
血液，新鲜或冻存的，并含抗凝血剂或口腔标本
10mmol/L NaCl/10mmol/L EDTA
4%（*m*/*V*）蔗糖水
50mmol/L 头孢匹胺氢氧化物

√1mol/L Tris · Cl, pH7.5
1.5ml 离心管
振动器
25ml 无菌塑料样本管
低速离心机
灭菌水

抽提血液 DNA

1a. 加 800μl 现配的 170mmol/L 依酚氯铵至装有 200μl 血液的 1.5ml 离心管中，振动器上混匀 20min，高速离心 2min 以获得细胞团，除去上清液。

2b. 用 300μl 的 10mmol/L NaCl/10mmol/L EDTA 洗细胞团，高速离心 15s。重复洗 3 次以除去可见的血红蛋白。

抽提口腔样本中 DNA

1b. 在口腔中剧烈振荡 10ml 4% (*m/V*) 蔗糖水 20s 以产生含有上皮细胞的悬浮液。用 25ml 无菌塑料样本管收集悬浮液。室温中 1200*g* 离心 10min 获得细胞。除去上清液。

为避免任何潜在的污染问题，要求收取上皮细胞悬浮液前 30min 时，禁用食物和饮料。

2b. 加 500μl 10mmol/L NaCl/10mmol/L EDTA 再次悬浮细胞并移至离心管。高速离心 15s 并除去上清液。

3. 用 500μl 的 50mmol/L NaCl/10mmol/L EDTA 重悬细胞团并旋转 10s 以重悬白细胞团。无菌水孵育 20min。

4. 加 100μl 的 1mol/L Tris · Cl 中和并旋转 5s。

5. 高速离心 15s 除去细胞屑。−20℃保存上清液（5μl 包含约 100μg DNA，足够一次 ARMS 反应）直至使用时。

参考文献：Ferrie *et al.*，1992；Newton *et al.*，1989

编者：Stephen Little

单元 9.8 线粒体 DNA 突变缺失氧化磷酸化疾病的分子分析

在线粒体和核 DNA 中，遗传或自发出现的突变可引起氧化磷酸化（OXPHOS）疾病。现今，17 种线粒体 DNA 的突变被病理生物学所证实，33 种突变也被临时证实（Wallace *et al.*，1995；表 9.8.1）。OZPHOS 疾病诊断的复杂性、mtDNA 突变的选择和特异性组织的分析都属于这一单元的内容。具体的讨论参考 Shoffner 和 Wallace（1995）。

表 9.8.1 mtDNA 突变总结[a]

已命名的 HGM突变[b,c]	核苷酸位置	基因/氨基酸	同型异源性[d]	异源性[d]	状态[c]
MTRNR1*ADPD956–965 insertion	5bp insertion between 956 和 965	12S rRNA	+	–	暂定为
MTRNR1*DEAF1555G	A to G: 1555	12S rRNA	+	–	确认为
MELAS:1642A	G to A: 1642	$tRNA^{Val}$	–	+	暂定为
MTRNR2*ADPD3196A	G to A: 3196	16S rRNA	+	+	暂定为
MTTL1*MELAS3243G	A to G: 3243	$tRNA^{Leu(UUR)}$	–	+	确认为
MTTL1*MM3250C	T to C: 3250	$tRNA^{Leu(UUR)}$	–	+	暂定为
MTTL1*MM3251G	A to G: 3251	$tRNA^{Leu(UUR)}$	–	+	确认为
MTTL1*MELAS3252G	A to G: 3252	$tRNA^{Leu(UUR)}$	–	+	暂定为
MTTL1*MELAS3256T	C to T: 3256	$tRNA^{Leu(UUR)}$	–	+	确认为
MTTL1*MMC3260G	A to G: 3260	$tRNA^{Leu(UUR)}$	–	+	确认为
MTTL1*MELAS3271C	T to C: 3271	$tRNA^{Leu(UUR)}$	–	+	暂定为
MTTL1*PEM3271Δ	Single-bp deletion: 3271	$tRNA^{Leu(UUR)}$	–	+	暂定为
MTTL1*MELAS3291C	T to C: 3291	$tRNA^{Leu(UUR)}$	–	+	暂定为
MTTL1*MM3302G	A to G: 3302	$tRNA^{Leu(UUR)}$	–	+	确认为
MTTL1*MMC3303T	C to T: 3303	$tRNA^{Leu(UUR)}$	+	+	暂定为
MTND1*NIDDM3316A	G to A: 3316	ND1: Ala to Thr	+	–	暂定为
MTND1*LHON3394C	T to C: 3394	ND1: Tyr to His	+	–	暂定为
MTND1*ADPD3397G	A to G: 3397	ND1: Met to Val	+	–	暂定为
MTND1*LHON3460A	G to A: 3460	ND1: Ala to Thr	+	+	确认为
MTND1*LHON4136G	A to G: 4136	ND1: Tyr to Cys	+	–	暂定为
MTND1*LHON4160C	T to C: 4160	ND1: Leu to Pro	+	–	暂定为
MTND1*LHON4216C	T to C: 4216	ND1: Tyr to His	+	–	确认为
MTTI*FICP4269G	A to G: 4269	$tRNA^{Ile}$	–	+	暂定为
CPEO:4285C	T to C: 4285	$tRNA^{Ile}$	–	+	暂定为
MTTI*MICM4300G	A to G: 4300	$tRNA^{Ile}$	–	+	暂定为
MTTI*FICP4317G	A to G: 4317	$tRNA^{Ile}$	?	?	暂定为
CME:4320	C to T: 4320	$tRNA^{Ile}$	–	+	暂定为
MTTQ*ADPD4336C	T to C: 4336	$tRNA^{Gln}$	+	–	暂定为
MTND2*LHON4917G	A to G: 4917	ND2: Asp to Asn	+	–	暂定为
MTND2*LHON5244A	G to A: 5244	ND2: Gly to Ser	–	+	暂定为
MTTW*DEMCH5549A	G to A: 5549	$tRNA^{Trp}$	–	+	暂定为
MTTN*CPEO5692G	A to G: 5692	$tRNA^{Asn}$	–	+	暂定为
MTTN*CPEO5703G	G to A: 5703	$tRNA^{Asn}$	–	+	暂定为
MTCOI*LHON7444A	G to A: 7444	COI: termination to Lys	+	–	暂定为
MTCOI*DEAF7445G	A to G: 7445	COI or $tRNA^{Ser(UCN)}$	+	+	确认为
MTTS1*AMDF7472+C	single bp insertion (C): 7472	$tRNA^{Ser(UCN)}$	+	+	暂定为
MTTS1*MERME7512C	T to C: 7512	$tRNA^{Ser(UCN)}$	+	+	暂定为
EM: 8272–8289 insertion (9 bp)	9 bp $(C)_5$ TCTA insertion between 8272 and 8289	Non-coding region between COII and $tRNA^{Lys}$	?	+	暂定为
MTTK*MERRF8344G	A to G: 8344	$tRNA^{Lys}$	–	+	确认为
MTTK*MERRF8356C	T to C: 8356	$tRNA^{Lys}$	–	+	确认为
SN: 8851C	T to C: 8851	ATP6: Trp to Arg	–	+	暂定为

续表

已命名的 HGM突变[b,c]	核苷酸位置	基因/氨基酸	同型异源性[d]	异源性[d]	状态[e]
MTATP6*NARP8993C	T to C: 8993	ATP6: Leu to Pro	−	+	确认为
MTATP6*NARP8993G	T to G: 8993	ATP6: Leu to Arg	−	+	确认为
MTATP6*LHON9101C	T to C: 9101	ATP6: Ile to Thr	+	−	暂定为
MTATP6*FBSN9176C	T to C: 9176	ATP6: Leu to Pro	+	+	暂定为
MTCO3*LHON9438A	G to A: 9438	COIII: Gly to Ser	+	−	暂定为
CrMy: 9487–9501 deletion	15bp deletion: 9487–9501	COIII	−	+	暂定为
MTCO3*LHON9738T	G to T: 9738	CoIII: Ala to Thr	+	−	暂定为
MTCO3*LHON9804A	G to A: 9804	COIII: Ala to Thr	+	−	暂定为
MTCO3*PEM9957C	T to C: 9957	COIII: Phe to Leu	−	+	暂定为
MTTG*MHCM9997C	T to C: 9997	$tRNA^{Gly}$	?	+	暂定为
MTTG*CIPO10006G	A to G: 10,006	$tRNA^{Gly}$	?	?	暂定为
SD: 10044G	A to G: 10,044	$tRNA^{Gly}$	−	+	暂定为
LHON+SD: 11696G	A to G: 11,696	ND4: Val to Ile	+	+	暂定为
MTND4*LHON11778A	G to A: 11,778	ND4: Arg to His	+	+	确认为
MTTS1*CIPO12246G	C to G: 12,246	$tRNA^{Ser(AGY)}$	?	?	暂定为
MTTL2*CPEO12311C	T to C: 12,311	$tRNA^{Leu(CUN)}$	+	+	暂定为
CPEO: 12315A	G to A: 12,315	$tRNA^{Leu(CUN)}$	−	+	暂定为
MTND5*LHON13708A	G to A: 13,708	ND5: Ala to Thr	+	−	确认为
MTND5*LHON13730A	G to A: 13,730	ND5: Gly to Glu	−	+	暂定为
MTND6*LDYT14459A	G to A: 14,459	ND6: Ala to Val	+	+	确认为
MTND6*LHON14484C	T to C: 14,484	ND6: Met to Val	+	+	确认为
MTTE*MDM14709G	A to G: 14,709	$tRNA^{Glu}$	−	+	暂定为
MTCYB*LHON15257A	G to A: 15,257	Cytochrome *b:* Asp to Asn	+	−	确认为
MTCYB*LHON15812A	G to A: 15,812	Cytochrome b: Val to Met	+	−	确认为
MTTT*LIMM15923G	A to G: 15,923	$tRNA^{Thr}$	?	+	确认为
MTTP*MM15990T	C to T: 15,990	$tRNA^{Pro}$	−	+	暂定为

a. 参考 Wallace 等（1995）的每一种 mtDNA 突变引物。

b. 在录入时，HGM 设计（原生质网，http://Infinity. gen. emory. edu/mitomap. html）没有指定以下：MELAS：1642A（Taylor *et al.*，1996），CPEO：4285C（Silvestri *et al.*，1995），EM：8272-8289 insertion（9bp）（Fabrizi *el al.*，1995），GrMy：9487-9501 deletion（Keightly *et al.*，1996），SD：10044G（Santorelli *et al.*，1996），LHON+SD：1169G（De Vries *et al.*，1996），CPED：12315A（Fu *et al.*，1996）。

c. 人类基因组图谱给出了每一种突变。为了表明第一个主题词就是染色体（MT），第二个是 mtDNA 基因突变，第三个是表型命名（见下述），第四个是突变位点，第五个是核苷酸改变。例如，癫痫引起肌阵挛和 Tagged-red fiber 的突变命名是 MTTK * MERRF8344G。这个主题词的 5 个组成部分位于括号内并用上标指出：(MT)[1] (TK)[2] * (MERRF)[3] (8344)[4] (G)[5]。HGM，人类基因图谱；AA，多肽中氨基酸改变。表型的描述：AD，阿尔兹海默症；ADPD，阿尔兹海默症和帕金森疾病；CIPO，伴有眼肌麻痹的 chronic 肠假性梗阻；CME，心肌病和脑病；CPEO，chronic progressive external ophthalmoplegia；CrMy，肌痛性痉挛；DEAF，遗传的氨基糖苷性耳聋；DMDF，糖尿病伴耳聋；FICP，致使婴儿心肌病加上 MELAS 伴生的心肌病；LDYT，Leber 的遗传性视觉神经病加上张力障碍；LHON，leber 的遗传性视觉神经病；LHON＋SD，Leber 遗传性视觉神经病和痉挛张力障碍；LIMM，致死婴儿线粒体肌病；MELAS，线粒体病，乳汁酸中毒，偶发作；MERRF，肌阵挛的癫痫症和溃烂红色纤维疾病；MM，线粒体肌病；MMC，遗传性心肌病；NARP，神经原（性）的肌无力，共济失调，视网膜炎；PEM，渐进性 encephalomyopathy；SD，猝死。

d. 帮助解释 mtDNA 突变的结果分析，当异质性或同型异源性的情况存在时，指定为“＋”，相反为“－”，当研究没有确定是否突变则是异质性或同型异源性。

e. 暂时的，单个的系谱被证实隐藏着突变；证实至少两种独立 Pedigress 已知有 mtDNA 突变。

基本方案 1　线粒体 DNA 的筛查用 Southern blot 研究基因重排

对于各种级别的 OXPHOS 疾病诊断，mtDNA 重排的缺失是很重要的。

注：mtDNA 超螺旋、多态现象和可能的断裂位点产生的条带模式，见 Wallace 等，(1995) mtDNA 重排和多态的目录。对于正确解释 Southern blot 的分析结果，证实异常分子大小是很重要的。

材料（标√的条目参见附录 1）

骨骼（单元 10.4）或白细胞的基因组 DNA（附录 3A）
10×restriction 缓冲液（提供内切核酸酶）
*Bam*HI 和 *Eco*RV 限制性内切核酸酶（8～12U/μl；Life Technologies）
5.0mol/L NaCl 溶液
100%和 70%乙醇
√6×胶聚蔗糖 loading 缓冲液
0.8%或 1%琼脂糖胶
DNA 分子质量标记：如 Kilobase ladder 和 λ*Hin*dⅢ digest（Life Technologies；大小分别为 75～12 216bp 和 564～23 130bp）
√1×TBE 缓冲液
√乙碘氯苯丁酯溶液
√杂交液
√2×SSC（现配）
精液 DNA（如 Stratagene）
>1×10^8 cpm/μg [α-^{32}P] dCTP mtDNA 探针（支持方案）
√0.5×、1×、2×SSC/0.1%（*m*/*V*）SDS（现配），65℃
离心机（20 000*g*）
55℃恒温箱
14cm×11cm×0.6cm 和 25cm×20cm×0.6cm 胶电泳仪（如 Life Technologies）
MP4 摄影机（Polaroid）and 55 类型 胶片或 Eagle Eye Ⅱ 视频影像显像系统（Stratagene）
荧光尺
Zeta 探针印迹薄膜（Bio-Rad）
DNA 正压转移装置（Stratagene）
紫外线 Stratalinker（Stratagene）
印迹纸（Schleicher&Schuell）
使用恒温箱和适合的杂交瓶 60～80℃杂交
磷光计（分子动力学）或柯达照相机高速 X（射）线胶片洗片器放射自显影胶片（用于常规放射自显影法）

1. 加 2.0～2.5μg 骨骼肌基因组 DNA 至一个标记的 1.5ml 离心管，如果要得到白细胞基因组 DNA，使用 4.0～4.5μg。

2. 选择 *Bam*HⅠ或 *Eco*RⅤ 用于分析每一个样本（表 9.8.2 的限制位点、片段大小、通常遇到的多态现象）。加适当的 10×限制缓冲液 40μl，加无菌去离子水至 400μl。

表 9.8.2　用 *Eco*RⅤ和 *Bam*HⅠ遇到的 mtDNA 多态现象

产生的共同片段	多态现象
*Eco*RⅤ（识别位点 GATATC）	
位置 12 871～3179：6877bp	16 274（G→A）：得到的位点 片段 6877bp 消化成两个片段：3403bp（位置 13404～3179）和 533bp（位置 12 871～13 404）
位置 12 871～6734：6137bp	6734（G→A）：位点消失 产生 6137bp 和 3555bp 片段的限制位点消失，导致形成一个 9692bp 片段（位置 3179～12 871）
位置 6734～3179：3555bp	—
*Bam*HⅠ（识别位点：GGATCC）	
位置 14 258，产生线性化 mtDNA 分子：16 569bp	16 491（T→G）：得到位点或 16 505（T→A）：得到位点
	16 389（G→A）：得到位点 当 14 258 限制（酶切）位点存在，产生 2141bp（位置 16 389～14 258）和 14 428bp（位置 14 258～16 389）两个片段：通常在高加索人中发生多态现象 14 258：丢失位点 13 368（G→A）：得到位点

3. 加 20U（2μl）所选的限制性内切核酸酶并孵育 37℃过夜（16～20h）。第二天早晨，另加 20U 酶并于 37℃继续孵育 2h。
4. 加 10μl 5.0mol/L NaCl 和 800μl 100％乙醇使 DNA 沉淀。倒转混合离心管内含物并 4℃孵育≥1h。
5. 20 000*g* 4℃离心样本 1h，轻轻倒出上清液并用 1.0ml 70％乙醇清洗沉淀物。20 000*g* 4℃离心 30min。轻轻倒出上清液并用真空干燥器把样本弄干。
6. 加 30μl 无菌去离子水重悬 DNA。若有必要，在 55℃ 热空白孔加热 30～90min 加速重悬。
7. 加 6μl 6×Ficoll 加样缓冲液，简单地旋转。
8. 加入用 *Bam*HⅠ 限制酶消化的样本（总体积 36μl）至一 0.8％（*m*/*V*）琼脂糖凝胶（25cm×20cm×0.6cm）中，或加入 *Eco*RⅤ限制酶消化的样本至 1.0％（*m*/*V*）琼脂糖凝胶（14cm×11cm×0.6cm）中。包括在单泳道的 DNA 分子质量标记。用 1×TBE 电泳缓冲液。
9. 为尽量检出小的重组，电泳移动 *Bam*HⅠ消化的片段在 0.35V/cm 时需 12kb 分子质量标记已移 12～14cm（36h）。电泳移动 *Eco*RⅤ消化的片段在 0.35V/cm 时需 1.0kb 分子质量标记已移至距凝胶末端 1cm（18h）。
10. 电泳完成后，照相记录（用 55 型 胶片的 Polaroid MP4 照相机）或数码记录（Stratagene Eagle Eye Ⅱ）分子大小的迁移。与大小标准排列一个荧光标记记录迁移距离并且大小标准的迁移与 mtDNA 迁移在放射能照像比较。
11. 脱嘌呤，变性，运用标准方法中和凝胶。
12. 根据制造商的技术说明书使用正面压力印迹装置转移 DNA 到 Zeta 探针膜。确定由乙

啡啶溴化物染色使 DNA 从胶凝体到膜转移并以紫外光透射照明检测荧光是成功的。

13. 使用紫外线照射（Stratalinker）交联 DNA 至膜上。
14. 加热杂交烤箱使预杂交液至 65℃。在 2×SSC 中使膜侵湿，适用于供应滤网的杂交烤箱膜以保证缓冲液通入，并且插入薄膜至一个玻璃杂交瓶中，这个做法的全部细节参见制造商的说明书。
15. 在 98℃用高频声波使鲑精 DNA 变性 10min 并加预热的预杂交液（一般每张薄膜 20ml 足够了）使最终浓度为 10μg/ml，加预杂交液至玻璃瓶中包括薄膜并于 65℃旋转 2～4h。
16. 使［α-^{32}P］dCTP-标记的 mtDNA 探针变性（5×10^5～5×10^6 cpm/ml 杂交缓冲液），在 95℃加热 5min 并用高频声波分裂鲑精 DNA（终浓度 10μg/ml）。
17. 加热 11ml（Hybaid 小型杂交瓶）或 25ml（Hybaid 大的杂交瓶）中杂交（溶）液至 65℃，然后加入变性的高频声波分裂的鲑精 DNA 和 mtDNA 探针。在玻璃瓶中用杂交（溶）液更换预杂交液并在 65℃旋转 18～20h。
18. 用 2×SSC/0.1% SDS 洗涤膜三次，每次30～60min。用 1×SSC/0.1% SDS 洗30～60min，然后再用 0.5×SSC/0.1% SDS 洗 30～60min。所有洗涤过程均在 65℃。
19. 无菌去离子水冲洗膜并用塑料袋封闭。柯达照相机高速 X（射）线胶片进行放射自显影（－20℃、1～3d）或磷光计分析（少数几小时根据制造商的推荐）。

支持方案　使用大范围 PCR 线粒体 DNA 探针的准备

用于这个扩增的 mtDNA 引物（Cheng *et al.*，1994）位于细胞色素 b 基因里。这个基因只有 300bp 没有被扩增。

附加材料（基本方案 1；标√的条目参见附录 1）

√10mmol/L 混合的 4dNTP

引物 1：5′-TGAGGCCAAATATCATTCTGAGGGGC-3′

引物 2：5′-TTTCATCATGCGGAGATGTTGGATGG-3′

Ampliwax PCR Gem 50（Perkin-Elmer）

长模板的 PCR 系统（Boehringer Mannheim）包括 1.75U/μl *Taq* DNA 聚合酶/*Pwo* DNA 聚合酶混合液和 PCR 缓冲液

正常个体粒细胞或骨骼肌的全基因组 DNA（附录 3A，单元 10.4）（1μl）

DNA 分子质量 marker：如 λ *Hind* Ⅲ 消化液（Life Technologies；大小范围 564～23 130bp）

√1×TBE 缓冲液包含 0.5μg/ml 溴化二氨乙啡啶

Qiaex Ⅱ Gel Extraction 试剂盒（Qiagen）

［α-^{32}P］dCTP（3000mCi/mmol；Amersham）

High Prime DNA 标记试剂盒（Boehringer Mannheim）

1. 混合以下试剂，用 0.5ml 微量离心管准备 PCR 反应混合物（每次反应总容量 30μl）：

   1.5μl 10 mmol/L 4dNTP 混合物；

   0.5μl 20 μmol/L 引物 1；

   0.5μl 20 μmol/L 引物 2；

27.5μl H_2O。

用于<20 个样本，对于 $n+1$ 个样本，准备充足的反应混合物（减去 *Taq* DNA 聚合酶/*Pwo* DNA 聚合酶混合物），然后分装至每管。

2. 加 Ampliwax PCR Gem 50 到每管，将每管放入热循环仪并加热 10min 至 80℃以使蜡熔化，接着让管子冷却直至蜡变硬。加入下列试剂到蜡的上层（总体积 20μl）：
5μl 10×PCR 扩增缓冲液；
50～250ng 正常个体全基因组（1μl）；
0.5μl 1.75/μl *Taq* DNA 聚合酶/*Pwo* DNA 聚合酶混合物；
13.5μl H_2O。
3. 将管子放入热循环仪，并使用下列参数扩增 mtDNA。

起始步骤：	120s	94℃（加热）
34 个循环：	10s	94℃（变性）
	10min	68℃（退火和延伸）
35 个循环：	10s	94℃（变性）
最终步骤：	4min	72℃（退火和延伸）

4. 加 5μl 6×Ficoll 加样缓冲液到 25μl PCR 反应液中。点样（终体积 30μl）至 0.8%（*m/V*）琼脂糖胶中（14cm×11cm×0.6cm，并在 0.35V/cm 下电泳，包括 DNA 分子质量 marker 在各个泳道。用含 0.5μg/ml 溴化二氨乙啡啶的 1×TBE 作为电泳缓冲液。

   λ*Hin*dⅢ 是确定 16.3kb mtDNA 片段的有效分子质量 marker。
5. 靠紫外线下溴化二氨乙啡啶的荧光条带鉴别 16.3kb mtDNA 片段。切下包含 16.3 kb mtDNA 带的琼脂糖胶区域，使用 Qiaex Ⅱ Gel Extraction 试剂盒纯化琼脂糖胶中的片段。
6. 要准备放射标记的 mtDNA 探针，使用 High Prime DNA 标记试剂盒标记 [α-^{32}P] dCTP（最终比放射性活度>1×10^8cpm/μg）（Boehringer Mannheim）。根据制造商的技术说明书或任意寡核苷酸合成（附录 3E）。

基本方案 2　PCR 产物限制性分析线粒体 DNA 点突变的筛查

mtDNA 点突变常产生（得到位点，SG）或失去（失去位点，SL）一个自然出现的限制性内切核酸酶位点，使位点检测变得直接，一个包含有错配的模板序列的 寡核苷酸引物常用于提供限制（酶切）位点给 PCR 扩增 mtDNA 片段（图 9.8.1）。

注：防止 PCR 的污染对准确检测 mtDNA 突变的是重要的，特别是当前患者组织的拷贝数低时。使用适当的防备措施，包括用 10% Clorox 洗吸管和紫外照射所有管子和吸管。另外，mtDNA 是高度多态的，详细了解 mtDNA 的多态现象对于解释检测结果是必需的。

材料（标√的条目参见附录 1）

10× PCR 扩增缓冲液：100mmol/L Tris · Cl，pH 8.3（附录 3A）/50mmol/L KCL/25mmol/L $MgCl_2$

1.25mmol/L 4dNTP 混合物

10pmol/μl 正反寡核苷酸引物（表 9.8.3）

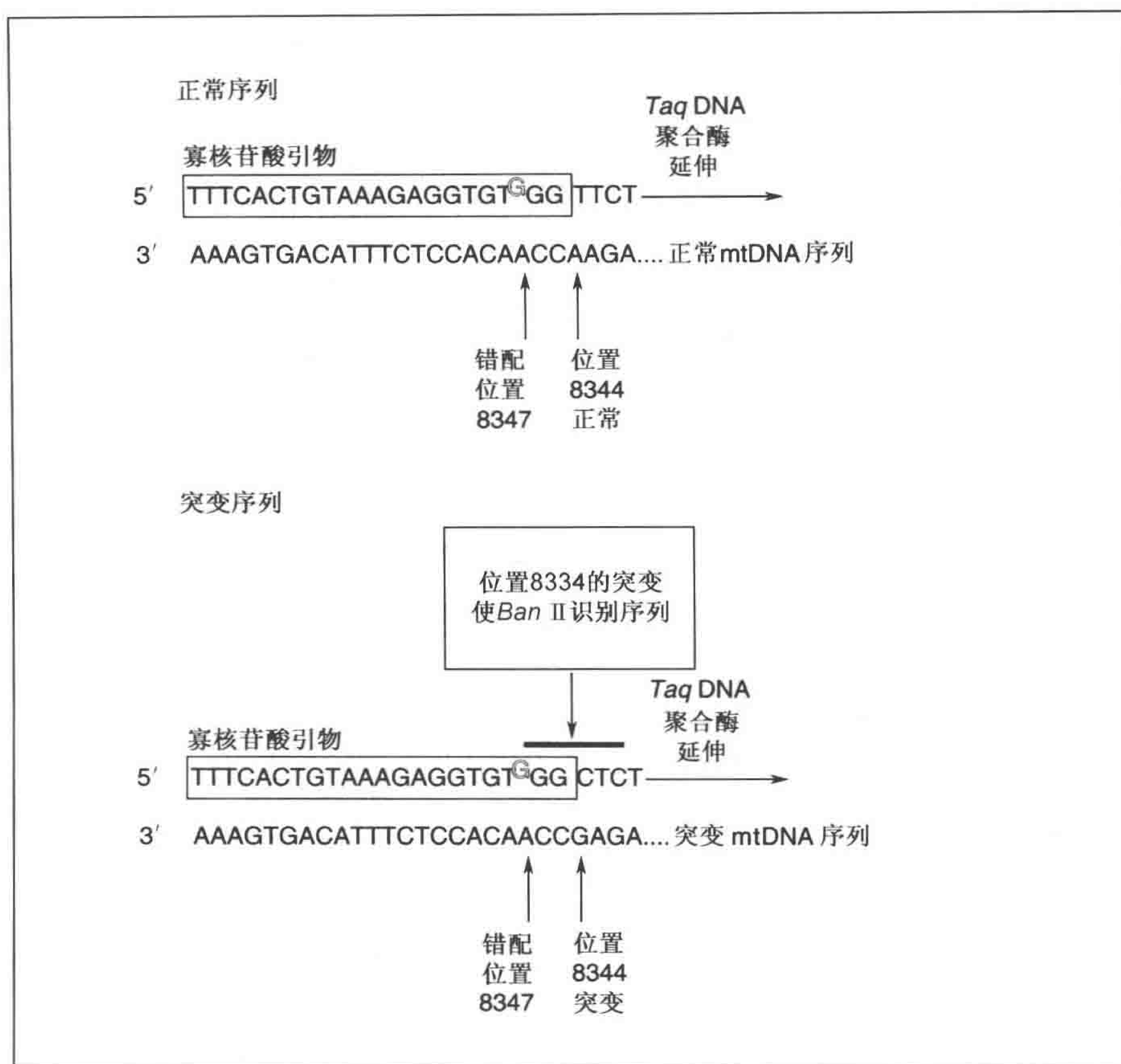


图 9.8.1　使用错配的寡核苷酸去证实 MTTK* MERRF8344G 突变。illustrated 是第一步扩增循环，其扩增的寡核苷酸被用来引进位于 mtDNA 8347 位置的碱基改变。在患者正常的 mtDNA 分子中，碱基改变的引进不能说明扩增片段里的 *Ban* Ⅱ 限制性位点。然而，当 MTTK* MERRF8344G 突变位于 8344 位置时，*Ban* Ⅱ 位点（GPGCQC）却产生了，如此在患者样本中识别突变。

5 U/μl *Taq* DNA 聚合酶

粒细胞或骨骼肌基因组 DNA（附录 3A）（单元 10.4）或血小板线粒体 DNA

石蜡油（游离核酸酶）

琼脂糖胶

10×限制性缓冲液（限制性内切核酸酶提供）

BSA

亚精胺

用于突变检测的限制性内切核酸酶（表 9.8.3）

√6×水溶性聚蔗糖凝胶加样缓冲液

DNA 分子质量标记：如 DNA 标记 V（Boehringer Mannheim；大小范围在 11～587bp）

√1×TBE 缓冲液

√溴化二氨乙啡啶液

UV Stratalinker (stratagene)

热循环 (Perkin-Elmer)

1. 使用下列试剂准备 PCR 反应混合液（每次反应总体积 48.75μl）：

5μl 10×PCR 扩增缓冲液；

8μl 1.25mmol/L 4dNTP 混合物；

1.5μl 10pmol/μl 正寡核苷酸引物；

1.5μl 10pmol/μl 反寡核苷酸引物；

32.75μl H_2O。

紫外线（254nm）照射反应混合液 5min。

用于<20 个样本，对于 n+1 个样本，准备充足的反应混合物（减去 *Taq* DNA 聚合酶），>20 个样本时，准备 n+2 个样本的反应混合液。

2. 加 *Taq* DNA 聚合酶（每次反应 0.25μl）至反应混合物，充分旋转混匀溶液，并且吸取 49μl 混合物到被标记的 0.5ml 离心管底部。将装有反应混合物的管子放在紫外线（254nm）下并照射 240 000J（几秒钟）。

3. 加 25～50ng 粒细胞或骨骼肌的基因组 DNA 或 5～10ng 血小板 mtDNA 到每个管子中，也包括未含 DNA 的空白对照。

当检测血液样品时，同时分析同一个体中的白细胞和血小板 mtDNA 对于确定结果和筛选实验失误是有用的。检测结果在白细胞和血小板样品应协调。

4. 用 2 滴游离核酸酶石蜡油覆盖 PCR 反应混合物并紧紧地盖上离心管的盖子。

5. 将样本放在热循环仪中并执行下列扩增的循环。

起始步骤：	120s	94℃（加热）
30 个循环：	60s	94℃（变性）
	60s	退火和延伸（表 9.8.3）
最终步骤：	60s	72℃（延伸）

6. 分装 10～15μl 的反应产物在琼脂糖胶中或 agarose/NuSieve（FMC Bioproducts）gel，以证实 PCR 产生了大小合适的片段，PCR 的空白对照是没有反应产物的，也不会产生额外大小的条带，否则就妨碍限制性内切核酸酶结果的解释了。

7. 加 10.0～15.0μl 被扩增的 mtDNA 片段到被标记的 0.5ml 离心管中。

8. 加下列的试剂至管中（用于<20 个样本，对于 n+1 个样本，准备充足的反应混合物，>20 个样本时，准备 n+2 个样本的反应混合液）：

2μl 适当的 10×限制缓冲液（表 9.8.3）；

BSA 和亚精胺根据制造商的推荐；

无菌去离子 H_2O 20μl；

10U 被选择的限制性内切核酸酶（表 9.8.3）。

选择适当的酶切温度孵育过夜（16～20h）

9. 加 4ml 6×Ficoll 上样缓冲液，振荡、点离。

10. 上样，电泳约 30μl（总体积样品），并点 DNA 标准品和阳性对照，以确定经酶切后 mtDNA 的大小。使用含约 0.05μg/ml EB 的 1×7BE 来电泳。

表9.8.3 mtDNA突变的检测参数[a]

已命名的HGM突变	引物1(正向)(5′→3′)	引物2(反向)(5′→3′)	退火温度/℃	限制性内切核酸酶[b]	mtDNA突变控测用的胶
12S 956–965 insertion	GCCTTTCTATTAGCTCTTAG (np 664–683)	AAGAGGTGGTGAGGTTGATC (np 1227–1246)	51	*Alu*I (5-bp insertion)	8% 聚丙烯酰胺
MTRNR1*DEAF1555G	AGACGTTAGGTCAAGGTG (np 1319–1336)	GTTTAGCTCAGAGCGGTC (np 1677–1660)	50	*BsmA*I (SL)	2% SeaKem 琼脂糖
MELAS:1642A	CCCACTCCCATACTACT (np 461–477)	TTGCGGTACTATATCTAT (np 1773–1790)	50	*Mbo*II (SG)	4% 聚丙烯酰胺
MTRNR2*ADPD3196A	CCCGATGGTGCAGCCGC (np 3007–3023)	GGCTACTGCTCGCAGTG (np 3701–3717)	55	*Ssp*I (SG)	2% SeaKem 琼脂糖
MTTL1*MELAS3243G	CCCGATGGTGCAGCCGC (np 3007–3023)	GCATTAGGAATGCCATTGCG (np 3351–3370)	55	*Hae*III (SG)	8% 聚丙烯酰胺
MTTL1*MM3250C	GGTTTGTTAAGATGGCAGAG[G]CCGG (np 3225–3249)	CACGTTGGGGCCTTTGCGTA (np 3404–3423)	45	*Nae*I (SG)	8% 聚丙烯酰胺
MTTL1*MM3251G	CCCGATGGTGCAGCCGC (np 3007–3023)	GGCTACTGCTCGCAGTG (np 3701–3717)	51	*Mbo*I (SG)	2% SeaKem 琼脂糖
MTTL1*MELAS3252G	ACATGCTAAGACTTCACCAG (np 2851–2870)	TGTAAAGTTTTAAGTTTTATG[T]GA (np 3253–3276)	51	*Mae*III (SG)	8% 聚丙烯酰胺
MTTL1*MELAS3256T	TGGCAGAGCCCGGTAA[A]CG (np 3237–3255)	CTAGGGTGACTTCATATGAG (np 3726–3745)	51	*Mae*II (SG)	8% 聚丙烯酰胺
MTTL1*MMC3260G	GAGCCCGGTAATCGC[T]TA (np 3242–3259)	GGCTACTGCTCGCAGTG (np 3701–3717)	55	*Dde*I (SG)	8% 聚丙烯酰胺
MTTL1*MELAS3271C[c]	CCCGATGGTGCAGCCGC (np 3007–3023)	GAATTGAACCTCTGACT[C]TAA (np 3272–3292)	55	*Dde*I (SG)	8% 聚丙烯酰胺
MTTL1*PEM3271Δ[c]	CCCGATGGTGCAGCCGC (np 3007–3023)	GAATTGAACCTCTGACT[C]TAA (np 3272–3292)	55	*Dde*I (SG)	8% 聚丙烯酰胺
MTTL1*MELAS3291C	AAAACTTAAAACTTTACAGTCAG-AGGTT[GG]AT (np 3259–3290)	GGGGTTCATAGTAGAAGAGCGATGG (np 3545–3569)	67	*Bam*HI (SG)	8% 聚丙烯酰胺
MTTL1*MM3302G	TTCAAATTCCTCCCTGTACG (np 3108–3127)	GGCTACTGCTCGCAGTG (np 3701–3717)	55	*Dde*I (SG)	8% 聚丙烯酰胺
MTTL1*MMC3303T	TCAGAGGTTCAATTCCTCTT[A]TTA (np 3278–3301)	GGCTAGAGGTGGCTAGAAT[T]AA (np 3615–3637)	51	*Ase*I (SG)	8% 聚丙烯酰胺
MTND1*NIDDM3316A[d]	AAGGTTCGTTTGTTCAACGA (np 3029–3048)	AGCGAAGGGTTGTAGTAGCC (np 3437–3456)	55	*Hae*III (SL)	8% 聚丙烯酰胺
MTND1*LHON3394C	GAGCCCGGTAATGCGTTA (np 3242–3259)	ccacaagcttGGCTACTGCTCGCAGTG (np 3701–3717 plus 10-bp tail)	51	*Hae*III (SG)	8% 聚丙烯酰胺

续表

已命名的HGM突变	引物1(正向)(5′→3′)	引物2(反向)(5′→3′)	退火温度/℃	限制性内切核酸酶[b]	mtDNA突变控测用的胶
MTND1*ADPD3397G	CCCGATGGTGCAGCCGC (np 3007–3023)	ccacaagcttGGCTACTGCTCGCAGTG (np 3701–3717 plus 10-bp tail)	51	*Rsa*I (SG)	2% SeaKem 琼脂糖
MTND1*LHON3460A	TTCAAATTCCTCCCTGTACG (np 3108–3127)	ccacaagcttGGCTACTGCTCGCAGTG (np 3701–3717 plus 10-bp tail)	51	*Bsa*HI (SL)	2% SeaKem 琼脂糖
MTND1*LHON4136G	CGCCGCAGGCCCCTTCGCCC (np 3951–3970)	TTTCTTAGGTTTGAGGGGG[C]ATGC (np 4244–4267)	52	*Sph*I (SG)	8% 聚丙烯酰胺
MTND1*LHON4160C[c]	CGCCGCAGGCCCCTTCGCCC (np 3951–3970)	TTTTTCATAGGAGGT[CC]ATG (np 4161–4180)	42	*Sty*I (SG)	8% 聚丙烯酰胺
MTND1*LHON4216C	CTCAACCTAGGCCTCCTA (np 3598–3615)	ATTTTGGATTCTCAGGGATG (np 4351–4370)	51	*Nla*III (SG)	2% SeaKem 琼脂糖
MTTI*FICP4269G	CGCCGCAGGCCCCTTCGCCC (np 3951–3970)	ACTCTATCAAAGTAACTCTTTTATCAGA[A]A (np 4270–4299)	55	*Ssp*I (SL)	8% 聚丙烯酰胺
CPEO:4285C	CCTACCACTCACCCTAGCATTAC (np 4185–4207)	GCGAGCTTAGCGCTGTGATGAGTG (np 4519–4542)	55	*Alu*I (SG)	12% 聚丙烯酰胺
MTTI*MICM4300G	AGAGTTACTTTGATAG[G]G (np 4281–4298)	GTGCGAGCTTAGCGCTGTGATG (np 4523–4544)	50	*Hph*I (SG)	8% 聚丙烯酰胺
MTTI*FICP4317G	GCATTACTTATATGATATG (np 4201–4219)	GATGGTAGAGTAGATGACGG (np 4489–4508)	55	*Afl*II (SG)	2% SeaKem 琼脂糖
CME: 4320T	CCTACCACTCACCCTAGCATTAC (np 4185–4207)	GTGCGAGCTTAGCGCTGTGATG (np 4523–4544)	60	*Mnl*I(SG)	12% 聚丙烯酰胺
MTTQ*ADPD4336C	CGCCGCAGGCCCCTTCGCCC (np 3951–3970)	AAAGATGGTAGAGTAGATGACGG (np 4489–4511)	55	*Ava*II (SG)	2% SeaKem 琼脂糖
MTND2*LHON4917G	GCACCCCTCTGACATCC (np 4831–4847)	GTGTTAGTCATGTTAGCTTG (np 5174–5193)	51	*Mae*I (SG)	8% 聚丙烯酰胺
MTND2*LHON5244A	GCACCCCTCTGACATCC (np 4831–4847)	CGGTCGGCGAACATCAGTGG (np 5898–5917)	51	*Hpa*II (SL)	2% SeaKem 琼脂糖
MTTW*DEMCH5549A	CTCATCGCCCTTACCACGCT (np 5454–5473)	GTATTGCAACTTACTGA[AA]G (np 5550–5569)	50	*Hind*III (SL)	8% 聚丙烯酰胺
MTTN*CPEO5692G	AAATGACAGTTTGAACATAC (np 5409–5428)	GTTGATTAGGGTGCTTA[A]CT (np 5697–5722)	47	*Alu*I (SL)	8% 聚丙烯酰胺
MTTN*CPEO5703G	GACTGCAAAACCCCACTCTG (np 5591–5610)	TGATTTTCATATTGAATTGC (np 5797–5816)	51	*Dde*I (SL)	8% 聚丙烯酰胺

续表

已命名的HGM突变	引物1(正向)(5′→3′)	引物2(反向)(5′→3′)	退火温度/℃	限制性内切核酸酶[h]	mtDNA突变控测用的胶
MTCOI*LHON7444A	CATACACCACATGAAACATCC (np 7240–7260)	GGGAAGTAGCGTCTTGTAG (np 7610–7628)	55	*Xba*I (SL)	2% SeaKem 琼脂糖
MTCOI*DEAF7445G	CTTCCCACAACACTTTCTCGG (np 7178–7198)	TGTAAAGGATGCGTAGGGATG (np 7821–7840)	55	*Xba*I (SL)	2% SeaKem 琼脂糖
MTTS1*AMDF7472+C	ACATAAAATCTAGACAAAAAAGG AAGGAATCGAACC[A]CCC (np 7432–7471)	CTTCTATGATAGGGGAAGTAGCGTC (np 7616–7640)	60	*Xcm*I (SG)	8% 聚丙烯酰胺
MTTS1*MERME7512C	ACCTGGAGTGACTATATGGATG (np 7375–7396)	GACAAAGTTATGAAATGGTTTTTC TAATACCTT[C]T[C]GA (np 7513–7550)	60	*Xho*I (SG)	8% 聚丙烯酰胺
EM: 8272–8289 insertion (9 bp)	Same as MTTK*MERRF8344G	Same as MTTK*MERRF8344G	50	*Ban*II (insertion)	8% 聚丙烯酰胺
MTTK*MERRF8344G	GGTATACTACGGTCAATGCTCT (np 8155–8176)	TTTCACTGTAAAGAGGTGT[G]GG (np 8345–8366)	50	*Ban*II (SG)	8% 聚丙烯酰胺
MTTK*MERRF8356C	GGTATACTACGGTCAATGCTCT (np 8155–8176)	ATTTAGTTGGGGCATTTCACT[C]TA (np 8357–8380)	55	*Xba*I (SG)	8% 聚丙烯酰胺
SN:8851	TAAACCTAGCCATGGCCATCCCC [G]TA (np 8825–8850)	GTGTTGTCGTGCAGGTAGAGGCTT [C]CT (np 9177–9203)	55	*BsiWI* (SG)	8% 聚丙烯酰胺
MTATP6*NARP8993G[f]	CCTAGCCATGGCCATCC (np 8829–8845)	CAGATAGTGAGGAAAGTTGA (np 9840–9859)	55	*Hpa*II (SG)	2% SeaKem 琼脂糖
MTATP6*NARP8993C[f]	CCTAGCCATGGCCATCC (np 8829–8845)	CAGATAGTGAGGAAAGTTGA (np 9840–9859)	55	*Hpa*II (SG)	2% SeaKem 琼脂糖
MTCO1*LHON9101C	Same as MTATP6*NAR8993G	Same as MTATP6*NAR8993G	55	*Hph*I (SG)	2% SeaKem 琼脂糖
MTATP6*FBSN9176C	GCCCTAGCCCACTTCTTAC (np 8896–8914)	GTGTTGTCGTGCAGGTAGAGGCTT [C]CT (np 9177–9203)	60	*Scrf*I (SG)	12%聚丙烯酰胺
MTCO3*LHON9438A	ATCCAAGCCTACGTTTTC (np 9151–9168)	CCGTAGTGGGGCGATTTA (np 9564–9581)	50	*Stu*I (SL)	2% SeaKem 琼脂糖
MTCO3*LHON9738T	ACTCCTAAACACATCCG[G]ATT (np 9596–9616)	GGAGACTCGAAGTACTCT[CC]GG (np 9739–9760)	55	*BspE*I (SG)	2% SeaKem 琼脂糖
MTCO3*LHON9804A	TCTCCCTTCACCATTTCC (np 9756–9773)	GAGTGATAGACGAAGTAG (np 9849–9866)	48	*Mae*III (SG)	8% 聚丙烯酰胺
MTCO3*PEM9957C	CATTTTGTAGATGTGGTTTGA[G]TA (np 9933–9956) or GCTCAGCATAGTCTAATAGAAAA (np 9645–9667)	GGGCAATTTCTAGATCAAATAA TAAGAAGGT (np 10,239–10,269) or ATCAATAGATGGAGACATAC [CT]AA (np 9958–9981)	55	*Rsa*I (SG) or *Dde* I (SG)	12%聚丙烯酰胺

续表

已命名的HGM突变	引物1(正向)(5′→3′)	引物2(反向)(5′→3′)	退火温度/℃	限制性内切核酸酶[b]	mtDNA突变控测用的胶
MTTG*MHCM9997C	AGCCGCCGCCTGATACTGGCAT (np 9914–9935)	GAATGTTGTCAAAACTAGTTAATTGG (np 10,022–10,047)	55	*Bfa*I (SG)	8% 聚丙烯酰胺
MTTG*CIPO10006G	GGGTCTTACTCTTTTAGT[T]TAA (np 9984–10,005)	GTAGTAAGGCTAGGAGGGTG (np 10,088–10,107)	53	*Dra*I (SG)	8% 聚丙烯酰胺
SD: 10044G	CTTTGGCTTCGAAGCCGCCGCCT (np 9902–9924)	GGGCAATTTCTAGATCAAATAATAA (np 10,245–10,269)	60	*Mae*II (SG)	12% 聚丙烯酰胺
MTND4*LHON11778A	CCCACCTTGGCTATCATC (np 11,141–11,158)	GGTAAGGCGAGGTTAGCG (np 11,851–11,868)	51	*Mae*III (SG)	2% SeaKem 琼脂糖
MTTS1*CIPO12246G	GAACTGCTAACTCATGCCCCC[GA]GT (np 12,221–12,245)	CTTTTATTTGGAGTTGCACCA[G]AAT (np 12,309–12,334)	60	*Eco*RI (SG)	8% 聚丙烯酰胺
MTTL2*CPEO12311C	GTTCATACACCTATCCCCCA (np 12,070–12,089)	TACTTTTATTTGGAGTTGCAC[TT]AA (np 12,312–12,336)	51	*Afl*II (SG)	8% 聚丙烯酰胺
CPEO: 12315	ACTCATGCCCCCATGTCTAA (np 12,230–12,249)	TACTTTTATTTGGAGT[G]GCA (np 12,336–12,317)	50	*Ban*I (SL)	8% 聚丙烯酰胺
MTND5*LHON13708A	CGCAGCAGTCTGCGCCC (np 13,197–13,213)	GGGGATTGTGCGGTGTGTG (np 13,932–13,950)	55	*Bst*NI (SL)	2% SeaKem 琼脂糖
MTND5*LHON13730A	TCATCGAAACCGCAAACATA (np 13,520–13,539)	TGCTAGGGTAGAATCCGAGT (np 13,911–13,930)	51	*Tsp*5091 (SG)	2% SeaKem 琼脂糖
MTND6*LDYT14459A	ATGCCTCAGGATACTCCTCAATAGCC[G]TC (np 14,430–14,458)	CTTCTAAGCCTTCTCCTATT (np 14,595–14,615)	51	*Mae*III (SG)	8% 聚丙烯酰胺
MTND6*LHON14484C	AAACAATGGTCAACCAG[G]AAC (np 14,191–14,210)	TTTTTTTAATTTATTTAGGGGG[CC]TG (np 14,485–14,509)	45	*Mva*I (SG)	2% SeaKem 琼脂糖
MTTE*MDM14709G	CACGGACTACAACCACGACCAAT [C]ATA (np 14682–14708)	GGAGGTCGATGAATGAGTGGT (np 14,790–14,810)	60	*Nde*I (SG)	12% 聚丙烯酰胺
MTCYB*LHON15257A	GAATCTGAGGAGGCTACTCA[T]TA (np 15,234–15,256)	GATCCCGTTTCGTGCAAG (np 15,343–15,360)	51	*Mse*I (SG)	8% 聚丙烯酰胺
MTCYB*LHON15812A	CTAAGCCAATCACTTTATTG (np 15,704–15,723)	TTCAATTAGGGAGATAGTTGG (np 15,845–15,865)	42	*Rsa*I (SL)	8% 聚丙烯酰胺
MTTT*LIMM15923G	GCGGTTGTTGATGGGTGAGT (np 14947–14966)	CCACATCACTCGAGACGTAA (np 14,947–14,966)	60	*Acc*I (SG)	2% SeaKem 琼脂糖
MTTP*MM15990T	GGCGACCCAGACAATTA (np 15,497–15,513)	TTTAAATTAGAATCTTA[T]CT[C]TG (np 15,991–16,013)	45	*Dde*I (SG)	8% 聚丙烯酰胺

a. 这些mtDNA突变的原始参考文献参照Wallace等（1995）。np.核苷酸位置。
b. SL.位点缺失；SG，位点获得。
c. *Dde*I分析不能区分这两个突变，单核苷酸缺失的突变（MTTL1*PEM 3271Δ）的检测可使用mtDNA测序。
d. 用于MTTL1*MELAS 3243G仅用的寡核苷酸可在这使用。用*Hae*III消化mtDNA片段可用于检测MTTL1*MELAS 3243G和MTND1*NIDDM 3316A的突变。
e. 检测这个突变时，加入终浓度为1%的DMSO到PCR缓冲液中。
f. 当使用*Hpa*II未检测突变时，如果是TG或TC突变那么将产生一个酶切位点。如果区别这两种突变，则可使用*Ava*I来消化PCR产物。只有TG突变的情况才会产生该限制酶的酶切位点。

参考文献：Hammans *et al.*，1991；Wallace，*et al.*，1995
编者：John M. Shoffner

单元 9.9　单细胞 DNA 和 FISH 分析应用于植入前基因诊断

这个单元描述的特殊的基因位点的所有分析也许会使用 PEP（支持方案 1），因为扩增的第一步比 PCR 的主要部分更重要。可是有些分析并不需要 PEP，这些也许是很重要 PCR 部分。只有Ⅷ因子基因（血友病）和 DMD 基因包括 PEP 在内使用这个分析的一部分。

在分裂间期的信息，FISH 能发现（单元 4.4 和单元 8.6）。

注：在基本方案 1 中描述的分子分析程序和它附带的支持方案要求非常谨慎，以防止外来 DNA 的污染。技术人员应该穿一次性外衣，包括帽子、防毒面具、鞋套和干粉剂手套，以防止胚胎污染和工作范围内的 DNA 扩增。悬浮微粒-屏障移液管头（如 Continental Lab Products）应用于每一个吸液步骤。

基本方案 1　单倍体细胞具体基因位点的分析

注：使用 HPLC 优质水（如 Fisher）准备所有溶液并按全部方案步骤要求使用 HPLC 优质水。

材料（标√的条目参见附录 1）

0.5ml 管中的单细胞或（卵）裂球，用石蜡油覆盖使其溶化并中和（支持方案 2、3 和 4），对照管应符合这个条件
√10×游离钾扩增缓冲液
√25mmol/L 4dNTP 混合液（Boehringer Mannheim）
20μmol/L 正反引物（表 9.9.1）
5U/μl *Taq* DNA 聚合酶（AmpliTaq 来自 Perkin-Elmer）
√10×PCR 含 15mmol/L $MgCl_2$ 扩增缓冲液
轻石蜡油（Perkin-Elmer）
20μmol/L 次级 PCR 正反内外引物（表 9.9.2）
DNA 片段所知纯合子 *CFTR*△F508 突变基因 DNA 或 *HEXA* 外显子 11＋TATC 突变基因组 DNA 和纯合子正常 DNA，在合适的位点使用内部引物进行 PCR 扩增（30 个循环 20～50ng 开始基因组的模板）（表 9.9.2）
√10×TBE 缓冲液
√DNA 凝胶上样缓冲液
分子质量大小：使用 *Hae*Ⅲ消化 ΦⅩ-174 质粒
√0.1μg/ml 溴化二氨乙啡啶液
√5×*Dde*Ⅰ消化缓冲液
限制性酶：*Dde*Ⅰ、*Bcl*Ⅰ和 *Hae*Ⅲ

10×One-Phor-All 缓冲液 Plus（Pharmacia Biotech）

0.5ml 澄清聚丙烯 PCR 反应管（out patient Services）

表 9.9.1　引物序列和初级 PCR 浓度

位点	引物	序列（5′→3′）	最终浓度 /μmol/L	10 个反应的反应体积[b] /μl	产物大小 bp
*CFTR*ΔF508	1F	GACTTCACTTCTAATGATGAT	0.8	20	193/190
	1R	CTCTTCTAGTTGGCATGC	0.8	20	
DMD exon 4	1F	TTGTCGGTCTCCTGCTGGTCAGTG	0.25	6.25	196
	1R	CAAAGCCCTCACTCAAACATGAAGC	0.25	6.25	
DMD exon 8	1F	GTCCTTTACACACTTTACCTGTTGAG	0.25	6.25	360
	1R	GGCCTCATTCTCATGTTCTAATTAG	0.25	6.25	
DMD exon 12	1F	GATAGTGGGCTTTACTTACATCCTTC	0.25	6.25	331
	1R	GAAAGCACGCAACATAAGATACACCT	0.25	6.25	
DMD exon 45	1F	AAACATGGAACATCCTTGTGGGGAC	0.25	6.25	547
	1R	CATTCCTATTAGATCTGTCGCCCTAC	0.25	6.25	
DMD exon 48	1F	TTGAATACATTGGTTAAATCCCAACATG	0.25	6.25	506
	1R	CCTGAATAAAGTCTTCCTTACCACAC	0.25	6.25	
FVIII intron 18	HA1F	CTACCTGGCTTAGTAATGGCTC	0.8	20	429
	HA1R	AAAGGAATAAATTCCTTTTCCC	0.8	20	
HEXA exons 11 & 12	TS-F	GGTGTGGCGAGAGGATATTCCA	0.8	20	580/584
	TS-R	TCTCTCAGGCCTGAAAGAAGGG	0.8	20	
ZFX & *ZFY*	Z868F	ACCRCTGTACTGACTGTGATTACAC	0.4	10	495
	Z1338R	GCACYTCTTTGGTATCYGAGAAAGT	0.4	10	

a. R=A 或 G；Y=C 或 T。

b. 见基本方案第 2a 和 2b 步。

表 9.9.2　二级 PCR 的引物序列

位点	引物	序列（5′→3′）	最终浓度 /μmol/L[b]	10 个反应的反应体积[b] /μl	产物大小 bp
*CFTR*ΔF508	2F	TGGGAGAACTGGAGCCTT	0.8	20	154/151[c]
	2R	GCTTTGATGACGCTTCTGTAT	0.8	20	
DMD exon 4	1F	TTGTCGGTCTCCTGCTGGTCAGTG	0.25	6.25	168
	2R	CTGTGTCACAGCATCCAGACCTTGT	0.25	6.25	
DMD exon 8	2F	TCATGGACAATTCACTGTTCATTAA	0.25	6.25	321
	1R	GGCCTCATTCTCATGTTCTAATTAG	0.25	6.25	
DMD exon 12	1F	GATAGTGGGCTTTACTTACATCCTTC	0.25	6.25	301
	2R	TATGTTGTTGTACTTGGCGTTTTAG	0.25	6.25	
DMD exon 45	2F	GCTCTTGAAAAGGTTTCCAACTAAT	0.25	6.25	506
	1R	CATTCCTATTAGATCTGTCGCCCTAC	0.25	6.25	
DMD exon 48	1F	TTGAATACATTGGTTAAATCCCAACATG	0.25	6.25	444
	2R	AATGAGAAAATTCAGTGATATTGCC	0.25	6.25	
FVIII intron 18	HA2F	ATCAAAGGATTCGATGGTATCT	0.8	20	339
	HA2R	TTTCCTTTTTAGCAATTTTTCT	0.8	20	
HEXA exon 11	TS11F	AACTGGTCACCAAGGCCGGCTT	0.8	20	118/122[d]
	TS11R	CCTTCAAATGCCAGGGGTTCCA	0.8	20	
HEXA exon 12	TS12F	CAGGTACCCCTGAGCAGAAGGC	0.8	20	176
	TS12R	GGTGGCTAGATGGGATTGGGTC	0.8	20	
ZFX & *ZFY*	Z916F	AYAACCACCTGGAGAGCCACAAGCT	0.4	10	344
	Z1233R	TGCAGACCTATATTCRCAGTACTGGCA	0.4	10	

a. R=A 或 G；Y=C 或 T。

b. 另见基本方案，步骤 5。

c. ΔF508 删除突变片段为 3bp 长。

d. +TATC 插入突变片段为 4bp 长。

热循环（PTC-100 或－200 from MJ Research；DNA 热循环或 DNA 热循环 480，Perkin-Elmer）。

PAGE 高分辨制作和电泳仪（MiniProtean Ⅱ，Bio-Rad）

1. 如果适当，按照 PEP（单元 1.3）溶解中和单细胞或卵裂球（支持方案 1）。

当在 DMD 基因内使用不同的外显子比较分析检测到缺失时，准备用 *Hae*Ⅲ消化 PCR 产物是很有必要的。*ZFX* 和 *ZFY* 基因与相关的 DMD 外显子 PCR 产物的 PCR 产物相等。因此，当符合 DMD 基因的步骤排除后，第 2～7 步和第 8d 步必须使用 *ZFX* 和 *ZFY* 基因的材料和条件。

在未执行 PEP 的地方执行的主要 PCR（直接单位点 PCR）

2a. 准备以下 10 次反应的标准混合液以保证分析每 10 个细胞或卵裂球：

50μl 10×游离钾扩增缓冲液（1×终浓度）；

5μl 25mmol/L 4dNTP 混合物（0.25mmol/L each dNTP 终浓度）；

6.25～20μl 20μmol/L 正向引物（0.25～0.8μmol/L 终浓度；表 9.9.1）；

6.25～20μl 20μmol/L 反向引物（0.25～0.8μmol/L 终浓度；表 9.9.1）；

2μl 5U/μl *Taq* DNA 聚合酶（1U 每次反应 final）；

加 H_2O 至 450μl。

3b. 加 45μl 标准混合液 B 到每个现备的 0.5ml PCR 反应管 5μl 部分单细胞/卵裂球 PEP 反应产物中，加 50μl 石蜡油覆在反应液上面。

4. 每个位点做初级 PCR 使用热循环的条件参见表 9.9.3。

表 9.9.3　初级 PCR 的条件

位点	首次变性		循环							最后延伸		浸泡
			循环次数	变性		退火		延伸				
	温度/℃	时间/s		温度/℃	时间/s	温度/℃	时间/s	温度/℃	时间/s	温度/℃	时间/s	温度/℃
CFTR△F508	93	180	20	92	45	40	45	72	90	72	300	4
DMD(所有外显子)	94	120	20	94	30	52	60	65	60	—[a]	—[a]	4
*FV*Ⅲ内含子 18	92	180	20	92	30	49	30	72	30	72	180	4
HEXA 外显子 11 和 12	93	180	20	92	40	54	60	72	90	72	300	4
ZFX/*ZFY*	97	120	20	94	45	49	60	72	60	—[a]	—[a]	4

a. 没有最终延伸步骤。

5. 准备 10 次反应的标准混合液以备 9 次足够的次级 PCR：

50μl 10×PCR 扩增缓冲液包含 15mmol/L $MgCl_2$(1×终浓度)；

5μl 25mmol/L 4dNTP 混合液(0.25mmol/L 每个 dNTP 终浓度)；

5～20μl 20μmol/L 正向内部引物(0.2～0.8μmol/L 终浓度;表 9.9.2)；

5～20μl 20μmol/L 反向内部引物(0.2～0.8μmol/L 终浓度;表 9.9.2)；

2μl 5U/μl *Taq* DNA 聚合酶(1U/每次反应终浓度)；

加水至 480 μl。

可选择联合 PCR 引物中相对核心的一种引物(如半嵌合 PCR)。

6. 从第 5 步加 48μl 标准混合液至一个含 2μl 初级 PCR 产物的新反应管中。加 50μl 石蜡油覆在反应液上面。
7. 用表 9.9.4 中描述的条件在热循环仪中对每个位点进行第二次 PCR。

表 9.9.4　次级 PCR 的条件

位点	首次变性		循环							最后延伸		浸泡
			循环次数	变性		退火		延伸				
	温度/℃	时间/s		温度/℃	时间/s	温度/℃	时间/s	温度/℃	时间/s	温度/℃	时间/s	温度/℃
CFTR△F508	93	180	30	92	45	40	45	72	90	72	300	4
DMD(所有外显子)	94	120	30	94	30	52	30	65	60	—[a]	—[a]	4
*FVⅢ*内含子 18	92	180	30	92	30	46	30	72	30	72	180	4
HEXA 外显子 11	93	180	30	92	40	57	60	72	90	72	300	4
外显子 12	93	180	30	92	40	60	60	72	90	72	300	4
ZFX/ZFY	97	60	30	94	45	58	45	72	60	—[a]	—[a]	4

a. 没有最终延伸步骤。

通过异源双链核酸分子形成去解释 *CFTR*△*F*508 或 *HEXA* 的外显子 11+TATC 突变

8a. 从对照样本与扩增的待检样品中取 5μl 与以前扩增的已知或杂合样本或 *CFTR* △F508 或 *HEXA* 的外显子 11+TATC 突变的样本等体积混合(推荐用两个正常样本和一个突变)。

9a. 在 93℃下加热混好的样本 10min,使所有的 DNA 链变性,然后冷却到 65℃保持 10min,使单链复性。

10a. 用微型蛋白Ⅱ微型 PAGE 胶模型仪器,在 1×TBE 缓冲液中准备 8%~10%的非变性聚丙烯酰胺(单元 7.2)。

11a. 加入 1μl DNA 10×的上样缓冲液到每个样品中然后点到微胶上,其中一个泳道上包括 DNA marker。

12a. 在 200V 下电泳样品 30min,用 0.1μg/ml 溴化乙锭染色 10min。分析胶检测出来突变,这些与正常样本分别相差 3bp 和 4bp。

通过直接数据录入解释 HEXA 的外显子/内含子 12 的点突变

8b. 加入 4μl 5×*Dde* Ⅰ 消化缓冲液到 15μl 扩增好的检测样品和对照样品中,然后加入 20~25U *Dde* Ⅰ,在 37℃孵化 90min。

9b. 用微型蛋白ⅡPAGE 微型胶模型仪器,在 1×TBE 缓冲液中准备 10%的非变性聚丙烯酰胺(单元 7.2)。

10b. 加入 2μl DNA 10×的上样缓冲液到每个样品中然后点到微胶上,其中一个泳道上包括 DNA marker。

11b. 在 200V 下电泳样品 30min,用 0.1μg/ml 溴化乙锭染色 10min。分析胶中检测的突变,突变体的消化产物另外有个 85bp 的片段。

以 *Bcl* Ⅰ 消化去检测 *FV*Ⅲ 基因的内含子 18 中的限制性位点多态性。

8c. 加入 30U *Bcl* Ⅰ 到每个扩增好的检测样品和对照样品中，直接在 50℃ 的油中孵化 60min。

9c. 用微型蛋白Ⅱ PAGE 微型胶模型仪器，在 1×TBE 缓冲液中准备 8% 的非变性聚丙烯酰胺（单元 7.2）。

10c. 取 10μl 已消化的产物与 1μl 10×上样缓冲液相混，然后点到微胶上，其中一个泳道上包括 DNA marker。

11c. 在 200V 下电泳样品 30min，用 0.1μg/ml 溴化乙锭染色 10min。分析胶检测到的突变，突变体的酶切产物另外有 339bp、222bp、117bp 片段的带（当为杂合子时），或仅仅有 339bp 片段的带（当为纯合子时）。

通过 *Hae*Ⅲ 酶切辨认 *ZFX* 和 *ZFY* 基因

8d. 加入 5μl 扩增好的检测样品和对照样品到 5μl 2×One-Phor-All 缓冲液中，其中包括 5U *Hae*Ⅲ，在 37℃ 孵化 90min。

9d. 用微型蛋白Ⅱ PAGE 微型胶模型仪器，在 1×TBE 缓冲液中准备 5%～8% 的非变性聚丙烯酰胺（单元 7.2）。

10d. 加入 1μl DNA 10×的上样缓冲液到每个酶切的样品中然后点到微胶上，其中一个泳道上包括 DNA marker。

11d. 在 200V 下电泳样品 30min，用 0.1μg/ml 溴化乙锭染色 10min。分析胶中检测到的突变：女性细胞产物片段为 300bp 和 44bp，男性细胞产物片段为 300bp、216bp、84bp 和 44bp。

通过比较分析不同的外显子去检测 *DMD* 基因的缺失

8e. 在 0.5%TBE 中准备 1.5%～3% 琼脂糖胶。

9e. 加入 1μl DNA 10×的上样缓冲液到每个扩增的样品或对照样品中然后点到琼脂糖胶上。

10e. 点 *Hae*Ⅲ 酶切的 *ZFX* 和 *ZFY* 产物到同一个胶上，其中一个泳道上包括 DNA marker。

11e. 在 10V/cm 下电泳样品 20～30min，用 0.1μg/ml 溴化乙锭染色 20min。分析胶中检测到的突变（在表 9.9.2 中看片段大小）。

支持方案 1　引物延伸预扩增法（primer-extension preamplification，PEP）扩增单个二倍体细胞全基因组

具体设置见单元 1.3 支持方案 2。注意配制溶液和所有步骤中均使用 HPLC 级别的水（如 Fisher，见附录）。另外，在步骤 1 准备 10 个反应所需 PED 溶液，而不是 100 个；步骤 2 中在 0.5ml 的管子中放入单个二倍体细胞或卵裂球，而不是精子；步骤 4：在运行 PEP 扩增循环时改用下述参数：

起始步骤：	5min	95℃	变性

50 个循环:	1min	92℃	
	2min	37℃	
	10s/℃ramp	37～55℃	
		55℃	
最后步骤:	5min	72℃	延伸

支持方案 2 植入前胚胎活检

注意: 接触细胞的溶液和仪器设备必须经过适当的方法进行灭菌或消毒;培养基和溶液须用 0.22μm 的 Millex-GV(Millipore 公司)滤膜过滤;轻矿物油须用 0.45μm 的滤膜(Nalgene 公司)过滤;过滤时最初的小部分应予以丢弃;玻璃毛细管在 120℃高温干燥灭菌 3h;对于微量吸管和 PCR 管须用紫外交联仪最大能量照射 15min。

注意: 在配制与胚胎接触的试剂和培养基时使用 Milli-Q 纯净水(符合美国病理学院试剂用水Ⅰ类标准),或胚胎测试过的超纯水。

注意: 移液管须在实验前预先准备好。

材料(标√的条目参见附录 1)

√Tyrodes 酸溶液

√胚胎培养液和洗涤液(方法见胚胎培养和显微操作相关培养基配制)

培养级轻矿物油(EM science 公司)过滤除菌,并用培养基洗涤和平衡

√活检用培养基(方法见胚胎培养和显微操作相关培养基配制)

√卵裂球洗涤液(方法见胚胎培养和显微操作相关培养基配制)

细胞裂解液:200mmol/L KOH/50mmol/L DTT(新鲜配制)

人胚胎

PCR 用轻矿物油(Perkin-Elmer 公司)或 Chill-Out 14 石蜡油(MJ Research)

√中性缓冲液

显微拉针仪(Sutter Instruments P-97 或 Narishige PB-7)

显微煅针仪(Narishige MF-9 或 Research Instruments MF42)

毛细玻璃管(Vitrocome 公司 Pyrex 管:外径 0.87mm,内径 0.7mm;或 Sutter Instruments 硼硅酸管:外径 1.0mm,内径 0.75mm),120℃高温干燥灭菌 3h

紫外交联仪

组织培养皿(Falcon):60mm×15mm、50mm×9mm、35mm×10mm

37℃、5% CO_2 培养箱(如 Forma)

37℃热板

0.5ml 清洁级聚丙烯 PCR 管(Out Patient Services)紫外交联仪最大能量照射 15min

Olympus IX70 倒置显微镜,配置 Hoffman 系统(40mm WD)、各类物镜(HMC EF 10×、HMC 20× LWD)、可水平调节载物台和 Brook stage warmer(另可选择配置相机、监视屏、录像机等)

钻石笔(玻璃刀也可)

抗震台(Newport)

双持针器(Narishige)

胚胎打孔和活检微管控制系统包括:

　　微驱动装置

　　气密注射器(Hamilton)

　　support base(base、微驱动装置和气密注射器可由 Stoelting 公司事先安装好)

　　连接器

　　聚丙烯管(Intramdic 公司 PE90)

胚胎吸持固定微管控制系统包括:

　　螺旋推栓气密注射器(Hamilton)

　　连接器

　　聚丙烯管(Intramdic 公司 PE90)

　　标准钳

两个直立显微操纵杆(Narishige;电动粗调和液压微调)

两个带光电源的体视镜,宽视场的更好

橡皮泥(可选)

嘴吸式的显微操纵系统(Fisher)须经过一个 0.22μm 的 Millex-GV(Millipore 公司)滤膜连接到一个长 60cm 的聚乙烯管后,再连接到显微持针器及持卵针上(Leica)或毛细管持卵管上(Microcap,Drummond)

层流罩

热板

1. 显微吸管(针)制备:用显微拉针仪、煅针仪和毛细管制备下述各针,并用紫外交联仪最大能量照射 15min 灭菌(适合 0.7mm×0.87mm 毛细管,如是 0.75mm×1.0mm 毛细管则可轻微上调):

   持卵针:65～80μm 外径(大一点也可),25～30μm 内径,加热磨光并使末端变钝;

   打孔针:5～10μm 外径;

   活检针:40～50μm 外径(适合于 8 细胞以下胚胎),30～40μm 外径(适合于 8 细胞以上胚胎),加热磨光并使末端变钝;

   细胞转移管:50～60μm 外径。

   为使在显微操作是高效地持卵、打孔和活检,各显微针最好准备一系列的尺寸型号,一套显微针可在同一个病例中重复使用,但是注意不要出现破损、细胞碎片附着,并保持其工作的高效性。

2. 制作胚胎转移装置:可用拉细的巴氏德管(端头内径 120mm),也可用机械吸胚中的毛细管代替(如 IVF 实验室中用于卵子去颗粒细胞和转移胚胎的毛细管)。

3. 将冻存的 Tyrodes 酸解冻后室温放置。

4. 为每个胚胎准备下述材料。

   a. 活检培养皿 1 个(用于活检胚胎的培养):在一个 60mm×15mm 组织培养皿中用培养基配制微滴,约 20μl,上面覆盖用培养基洗涤和平衡后的石蜡油,并将微滴培养皿置于 37℃、5% CO_2、饱和湿度的培养箱中平衡 1h 后待用。

   b. 活检皿 1 个:在一个盖子倒置 50mm×9mm 的组织培养皿中央用活检培养基配制

一个 20μl 的微滴，用一次性的吸管将滴稍铺开，再用足够的石蜡油(3ml)覆盖微滴；将组织培养皿置于层流罩或无菌环境(如放在一个更大的 150mm 的组织培养皿内)的 37℃热板上待用。

c. 培养皿 1 个(用于胚胎活检后培养)：在一个 60mm×15mm 组织培养皿中用培养基配制微滴，约 20μl，上面覆盖用培养基洗涤和平衡后的石蜡油，并将微滴培养皿置于 37℃、5%CO_2、饱和湿度的培养箱中平衡 1h 后待用。

d. 胚胎洗涤皿 1 个(用于胚胎洗涤)：在一个 35mm×10mm 组织培养皿加入约 2ml 培养基，置于 37℃、5%CO_2、饱和湿度的培养箱中预温和气体平衡 1h 后待用(也可在 a 步骤的皿中增加至 4 个微滴，其中 3 个微滴用于胚胎洗涤，1 个用于培养)。

e. 卵裂球洗涤皿(用于卵裂球洗涤)：在一个 35mm×10mm 组织培养皿加入约 2ml 卵裂球冲洗液培养基，置于室温下、体视镜旁。

f. PCR 反应管：准备 3 个 PCR 反应管(2 个用于卵裂球，1 个为空白对照)，每个管中加入 5μl 细胞裂解液。另外为整个诊断程序准备 2 个 PCR 空白管。

5. 利用倒置显微镜(配置 Hoffman 系统)在 200×和 400×的放大倍数下对胚胎的发育状况进行评定和分级。
6. 选择适合于活检的胚胎(一般为 6～10 个细胞的胚胎)，将待活检的胚胎分开放置于活检培养皿中，在皿底和皿盖用钻石笔进行标记编号后放回培养箱。

   为方便起见这一步可以省略，而将胚胎直接放入活检皿中(第 13 步)。
7. 在抗震台上调节好显微操作系统：安装 Holder 操作臂(右利手的人可将其置于左侧)，及在双持针臂上安装好打孔针和活检针(通常置于右侧)。
8. 将持卵针、打孔针和活检针分别通过各自的聚乙烯管连接到显微注射器上。
9. 调整好持卵针处于一个小角度状态，并指向倒置显微镜载物台上的照明区域。
10. 调整好显微注射器，通过加压将油推向针的末端，管道内如有气泡，一定要排除，并检查是否漏油。
11. 运用粗调和微调，降低各针至倒置镜视野范围内，并调整好打孔针和活检针的距离和聚焦。
12. 将打孔针浸入到 Tyrodes 溶液中，加负压使针充满 Tyrodes 溶液至离针尖约 5mm 处。
13. 将倒置显微镜载物台热板预热到 37.5℃(为抵消温度丧失使培养基保持在 37.0℃)。转移第一个胚胎至预先配制好的胚胎活检皿的微滴中，将活检皿放在热板中央。
14. 在低倍下(100×)对焦找到胚胎，持卵针稍加负压固定胚胎，旋动胚胎寻找比较好的活检处，并使之处于 3 点的位置。
15. 将显微镜转至高倍(根据个人需要使用 200×或 400×)，将打孔针接近或靠近透明带，缓慢加压排出 Tyrodes 溶液(注意慢，使注射器控制器的压力能有足够的时间传递到打孔针使 Tyrodes 溶液排出)。密切注意，当透明带快溶解穿透时，停止加压，退出打孔针。注意打孔的大小要确保活检针能进入透明带。将打孔针从微滴中移走。
16. 在低倍下(100×)对焦使活检针靠近胚胎，找到一个可辨别出核的卵裂球，将活检针穿过透明带开口，并靠近该卵裂球，注意两者之间不要有缝隙，稍加负压，卵裂球会部分进入活检针，这时，推、扭、拉、拖使卵裂球与邻近的卵裂球松开黏连，然后将卵裂球

尽可能全部吸入活检针。

17. 将活检针从胚胎中退出，轻加压将活检针中的卵裂球排出，使用机动台将活检卵裂球移出工作区。
18. 如果胚胎处于 8 细胞以上阶段，可同时分离两个卵裂球。
19. 持卵针释放胚胎，冲洗各针。将含有胚胎和卵裂球的活检皿转移至体视镜下(用胚胎转移装置冲洗卵裂球并依次转移到 PCR 反应管中)。最好有两台体视镜，并分别调好放大倍数和对焦，一台用于卵裂球回收，另一台用于洗涤，这样可免于重调体视镜的设置。
20. 在事先配制好的卵裂球洗涤皿中连续冲洗卵裂球，避免重复冲洗。
21. 打开 PCR 管盖，水平放置在体视镜旁，用橡皮泥或手固定 PCR 管，在体视镜下对焦 PCR 管中的上层液面。
22. 用嘴吸式的细胞转移装置将单个卵裂球转移到(携带尽可能少、体积的溶液)0.5ml PCR 管中(事先已经加入 5μl 裂解液)，即一只手拿住移液管，使管尖进入到 PCR 管中，当管尖快接近上层液面时(可先不用体视镜而直接观察并引导移液管进入 PCR 管)，在体视镜下观察，使管尖紧靠 PCR 管壁上并进入裂解液，缓慢加压可看到卵裂球进入裂解液。转移卵裂球时，要确认每个卵裂球都含有一个核并确实进入裂解液。立即在把原卵裂球的编号标记在 PCR 管上。冲洗移液管后才转移下一个活检皿中的卵裂球。
23. 从卵裂球洗涤皿中吸取少量体积的洗涤液，转入 PCR 管裂解液中作为空白对照。
24. 立即将含有胚胎的活检皿交给胚胎操作人员，将胚胎洗涤 3 次后转移至一新的胚胎培养微滴中和洗涤培养基中。
25. 对其他胚胎重复第 10～24 步。
26. 当所有卵裂球和空白样品在反应管中准备好后，层流罩下在每个 PCR 管中加入 50μl PCR 油或液体石蜡，点离数秒，使油或石蜡完全覆盖裂解液。
27. 将 PCR 管在 65℃热盖下孵育 15～30min，冷却到室温，加 15μl 中性缓冲液于反应体系中(加入到油或液体石蜡面以下)。

支持方案 3　分离有遗传缺陷胚胎的卵裂球用于进一步的检查

注意：该操作必须要得到患者的同意。

注意：接触细胞的溶液和仪器设备必须经过适当的方法进行灭菌或消毒；培养基和溶液须用 0.22μm 的 Millex-GV(Millipore 公司)滤膜过滤；轻矿物油须用 0.45μm 的滤膜(Nalgene 公司)过滤；过滤时最初的小部分应予以丢弃；玻璃毛细管在 120℃高温干燥灭菌 3h；对于微量吸管和 PCR 管须用紫外交联仪最大能量照射 15min。

注意：在配制与胚胎接触的试剂和培养基时使用 Milli-Q 纯净水(符合美国病理学院试剂用水 I 类标准)，或胚胎测试过的超纯水。

材料(标√的条目参见附录 1)

置于微滴培养皿(支持方案 2)的人类胚胎(有遗传缺陷；基本方案 1)

√Tyrodes 酸

√胚胎培养液和洗涤液(方法见胚胎培养和显微操作相关培养基配制)
√卵裂球洗涤液(方法见胚胎培养和显微操作相关培养基配制)
细胞裂解液:200mmol/L KOH/50mmol/L DTT(新鲜配制)
PCR用轻矿物油(Perkin-Elmer公司)或Chill-Out石蜡油(MJ Research)
胚胎转移装置(见支持方案2,第2步)
两个带光电源的体视镜,宽视场的更好
组织培养皿(Falcon):35mm×10mm
细胞转移装置(50~60μm外径,支持方案2,第1步)
嘴吸式的显微操纵系统(Fisher)须经过一个0.22μm的Millex-GV(Millipore公司)滤膜连接到一个长60cm的聚乙烯管后,再连接到显微持针器及持卵针上(Leica)或毛细管持卵管上(Microcap,Drummond)
0.5ml清洁级聚丙烯PCR管(Out Patient Services)紫外交联仪最大能量照射15min

1. 用胚胎转移装置将有遗传缺陷胚胎携带尽可能少的培养基转移至5μl Tyrodes酸滴中(在35mm×10mm组织培养皿中)。
2. 密切观察胚胎,1min内,可见透明带快溶解时,立即将胚胎转移洗涤皿中。如果透明带未溶解则将其转移至另一滴Tyrodes酸滴中。
3. 用胚胎转移装置将无透明带的胚胎立即转移到5μl卵裂球洗涤液中(在35mm×10mm组织培养皿中)。在卵裂球分散前将胚胎转移至第二滴洗涤液中(如胚胎在管径较小的吸管或细胞转移管中进出时,可造成卵裂球分散)。
4. 用嘴吸式的细胞转移装置将单个卵裂球转移到0.5ml PCR管中(事先已经加入5μl裂解液),覆盖PCR油或液体石蜡(支持方案2,第22~26步),储存在−70℃备用。

支持方案4 分离单个淋巴细胞或类淋巴母细胞

该方法描述从类淋巴母细胞株中分离单个细胞或分离单个新鲜准备的淋巴细胞,并用于单细胞DNA扩增实验模型。

小心:在处理人源性生物材料时一定要小心谨慎。如在吸取可能被EB病毒或其他病毒感染的细胞时要小心。

注意:接触细胞的溶液和仪器设备必须经过适当的方法进行灭菌或消毒;培养基和溶液须用0.22μm的Millex-GV(Millipore公司)滤膜过滤;轻矿物油须用0.45μm的滤膜(Nalgene公司)过滤;过滤时最初的小部分应予以丢弃;玻璃毛细管在120℃高温干燥灭菌3h;对于微量吸管和PCR管须用紫外交联仪最大能量照射15min。

注意:在配制试剂和溶液及所有的实验步骤中要求使用HPLC级别的水(如Fisher)。

材料(标√的条目参见附录1)

来自男性或女性配子捐赠者的待检的原代淋巴细胞或EB病毒转染的类淋巴细胞株
RPMI 1640+HEPES(Sigma),无血清和蛋白成分
细胞裂解液:200mmol/L KOH/50mmol/L DTT(新鲜配制)
橡皮泥(可选)
PCR用轻矿物油(Perkin-Elmer公司)或Chill-Out石蜡油(MJ Research)

√中性缓冲液

拉针仪(Sutter Instruments P-97 或 Narishige PB-7)

煅针仪(Narishige MF-9 或 Research Instruments MF42)

玻璃毛细管(Vitrocome 公司 Pyrex 管:外径 0.87mm,内径 0.7mm;或 Sutter Instruments 硼硅酸管:外径 1.0mm,内径 0.75mm;)

IEC 临床用离心机或相当的离心机也可

0.5ml 清洁级聚丙烯 PCR 管(Out Patient Services)紫外交联仪最大能量照射 15min

组织培养皿(Falcon):35mm×10mm

两个带光电源的体视镜,宽视场的更好(黑视场照明也可用)

嘴吸式的显微操纵系统(Fisher)须经过一个 0.22μm 的 Millex-GV(Millipore 公司)滤膜连接到一个长 60cm 的聚乙烯管后,再连接到显微持针器及持卵针上(Leica)或毛细管持卵管上(Microcap,Drummond)

层流罩

热板

1. 使用拉针仪、煅针仪器和玻璃毛细管制作一个 25μm 外径的微管,用紫外交联仪最大能量照射 15min 灭菌。
2. 洗涤淋巴细胞或和类淋巴母细胞 3 次,每次洗涤后室温下 1200*g* 离心 5min(IEC 临床用离心机),最后弃上清液,用 HEPES-buffered PRMI 培养基(不含蛋白血清等)重悬细胞。台盼蓝染色计算细胞活率(附录 31),仅高活率的细胞悬液才能被采用。
3. 无菌条件下,于 0.5ml 的 PCR 管(薄壁管或用 0.2μl 的 PCR 管,但方法需修改)中加 0.5μl 细胞裂解液并盖上盖子。
4. 在 35mm×10mm 的组织培养皿上滴加 3 滴或更多 HEPES-buffered PRMI 培养基(不含蛋白血清等),每滴 5μl,用细胞洗涤液,同时滴加 1 滴 0.5μl 细胞悬液(第 2 步准备的),上述各滴间靠近一些。
5. 打开 PCR 管盖,水平放置在体视镜旁,用橡皮泥或手固定 PCR 管,在体视镜下对焦 PCR 管中的上层液面。
6. 用嘴吸式的细胞转移装置,将微管进入培养基,转移少量细胞至第一滴细胞洗涤液滴,分离单个细胞并转移至下一个细胞洗涤液滴中,洗涤几次后,将携带尽可能少体积溶液的单个细胞转移到 PCR 管中(第 7 步)。或者,在 2ml 细胞悬液中分离细胞,至另一个含 2ml 培养基的培养皿中洗涤细胞,再转移至 PCR 管中。
7. 在体视镜旁观察,用一只手抓住携带细胞的微管,引导微管进入到 PCR 管中,当管尖快接近上层液面时,转至体视镜下观察,对焦 PCR 管中的上层液面及管壁,使管尖紧靠 PCR 上管壁并进入裂解液,缓慢加压可看到细胞进入裂解液。
8. 重复第 5~7 步直到很容易地可将细胞吸进微管(一般在微滴中每次吸 5~10 个细胞,在培养基细胞悬液每次吸 30~40 个细胞)。
9. 用同一个微管从细胞洗涤液中吸取少量体积的洗涤液,转入 PCR 管裂解液中作为空白对照。
10. 当所有 PCR 管准备好后,在层流罩下同时加入 PCR 反应试剂,并加入 50μl PCR 油或液体石蜡,点离。储存在−70℃待用。

11. 将 PCR 管在 65℃热盖下孵育 15～30min，冷却到室温，加 15μl 中性缓冲液于反应体系中（加入到油或液体石蜡面以下）。如果需要，可在－70℃储存数月。

基本方案 2　单个卵裂球 FISH

在植入前诊断（preimplantation genetic diagnosis，PGD）中采用 FISH 对单个卵裂球进行遗传学分析，要比其他细胞困难得多，这是因为有两个特别的原因：一是每个胚胎只能提供 1 或 2 个卵裂球用于检测，所以在结果获得和分析时，杂交效率（也受到卵裂球准备过程质量好坏的影响）成为一个决定性的因素；二是给予的时间特别短（如胚胎活检和分析在取卵后第三天进行，则胚胎移植常在第 4 天）。

材料（标√的条目参见附录 1）

活检好的卵裂球（支持方法 2，第 16 步）
√胚胎培养液和洗涤液（方法见胚胎培养和显微操作相关培养基配制）
√低渗/部分固定液
√3∶1 固定液
LSI 杂交缓冲液（Vysis 公司）
FISH 探针 1、2、3（Vysis 公司）
70%、80%、90%、100%乙醇
橡皮泥
√60%甲酰胺冲洗液，45℃
√2×SSC，pH7.0
√2×SSC，pH7.0，含 0.1% NP-40（Vysis 公司）
DAPI Ⅱ（Vysis 公司）
80μm 孔径的微管
2 孔 Nunc 培养板
带刻蚀环的 Clay Adams 玻片（用前用乙醇清洁）
玻片染色缸
18mm² 盖玻片（Fisher）
Hybrite 热板（Vysis 公司）或 80℃水浴箱
荧光显微镜

1. 大于 8 细胞的胚胎一般分离 1 或 2 个卵裂球，并尽可能快地，轻轻地将卵裂球从活检针中释放至活检培养基中。
2. 将持卵管上的胚胎释放，并转移出活检滴（小心避开活检好的卵裂球），转移至新配制的胚胎培养基和洗涤培养基中，平衡 1～2h 后置培养箱中培养。将含有卵裂球的培养板放在热板上，直到所有的胚胎活检完成。
3. 用 80μm 孔径的微管将卵裂球转移至一含有低渗/部分固定液的 Nunc 四孔板中（每孔中加入 1 个卵裂球），室温下放置 45s。
4. 将 Nunc 培养板中的卵裂球转移至带刻蚀环的 Clay Adams 玻片上。

5. 除去玻片上多余的液体，注意不要让卵裂球完全干燥。轻轻地在卵裂球上滴加 2 或 3 滴 3∶1 固定液。
6. 在相差显微镜上找到卵裂球，检查细胞核，用坐标或玻片定位器检测卵裂球的位置并记录好。用铅笔编号和标记好玻片。
7. 重复第 3～6 步，将每一个卵裂球分开放置于不同的玻片上。
8. 准备杂交混合液母液（每个卵裂球需 10μl），母液含 3 种 Vysis 探针。按下述方法配制（也可按厂家要求）：

LSI 杂交缓冲液	7μl
探针 1	1μl
探针 2	1μl
探针 3	1μl（如果只有 2 个探针则用 1μl 水代替）

不同染色体重排的携带者检查时需要选择不同的混合探针。Vysis 公司提供两种混合探针用于非整倍体筛查。

9. 将探针和杂交缓冲液置于 37℃水浴箱中预热 5min，使其达到室温。点离 1～3s。
10. 按照第 8 步将探针和杂交缓冲液混合好。
11. 点离 1～3s。

也可以数天前混合好，冻存备用。

12. 室温下，将玻片分别置于各含 70%、80%、90%、100%乙醇的染色缸中脱水 2min。
13. 将第 8～11 步配制好的 10μl 杂交混合液加到带刻蚀环的 Clay Adams 玻片上（含有卵裂球），用 18mm² 盖玻片盖上，周围用橡皮泥小心封好。
14. 将含卵裂球的玻片和探针在 80℃变性 3min。
15. 在 37℃的湿柜中过夜（有些探针所需时间要短些）。
16. 将盖玻片和橡皮泥移走，用 60%（或 50%，按厂家要求）甲酰胺（45℃搅拌预热 10min）冲洗玻片。
17. 将玻片转移至 2×SSC，室温下放置 10min。
18. 将玻片转移至 2×SSC/0.1% NP-40，室温下放置 5min。
19. 加 10μl DAPI Ⅱ至玻片上染色，盖上 24mm×50mm 盖玻片。荧光显微镜下观察。

支持方案 5　探针验证

对于所有 PGD 适应证的患者来说，在应用探针进行 PGD 检查之前，应常规地对夫妻双方外周血淋巴细胞（细胞中期或间期）进行检查以确认是否为染色体重排携带者。如果可能的话，探针也需要在卵裂球上验证，没有卵裂球则用其他类型的细胞（如绒毛细胞）也可。

材料

夫妻双方的外周血淋巴细胞

基本方案 2 中的探针（Vysis 公司）

绒毛细胞（单元 8.1）作为对照标本

1. 夫妻双方的外周血淋巴细胞培养，收获中期分裂相细胞（单元 4.1）。

2. 应用探针(分开或混合)对患者 5 个中期分裂相细胞进行杂交(单元 4.4)。
3. DAPI 染色(单元 4.3)提供带纹染色体,荧光显微镜下观察,记录探针位置。
4. 利用混合探针对夫妻双方外周血淋巴细胞进行杂交,计数 200～250 个细胞,计算杂交效率:

$$杂交效率=有杂交信号细胞数/检测细胞总数$$

5. 利用混合探针对绒毛细胞进行杂交,计数 200～250 个细胞,计算杂交效率

绒毛细胞中期分裂相可按照修饰直接法制备(单元 8.1 备选方法)。在该方法接下来的第 6～12 步中:第 6 步是将 2～4mg 绒毛置于低渗溶液中;第 8 步中 20min 的固定已足够;在第 12a 步中,玻片干燥后即可用于杂交。

参考文献:ESHRE PGD Consortium Steering Committee, 1999; Verlinski and Cieslak, 1993

编者:Patricia Minehart Miron, Samuel S. Chong, Robert E. Gore-Langton, and Mark R. Hughes

单元 9.10　蛋白质截短试验

注意:用于提取 RNA 的所有试剂和仪器都要进行灭菌,所有的溶液都要用焦磷酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC;DEPC 的处理方法见附录 1)处理,在提取 RNA 过程中需戴手套操作以防 RNase 污染。

注意:PCR 实验过程要极端小心以预防污染。

基本方案　非放射性蛋白质截短试验

注意:如果用 DNA 作为模板,则直接从第 9 步开始。

注意:电转须在低温条件下进行,电转过程中使用的胶、各种溶液和仪器设备等都需要制冷。

材料(标√的条目参见附录 1)

1～3μg 患者和正常人的保存于乙醇中的 RNA(支持方案)或 DNA 样品。
√3mol/L 乙酸钠,pH5.6(用乙酸调节 pH)
0.5μg/μl 随机引物(如 Promega 公司)或 10pmol/μl 基因特异性反向引物
反转录试剂盒(Roche Diagnostics 公司),带有 50U/μl 的延伸反转录酶和 5×缓冲液
100mmol/L 二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)(如 Life Technologies 公司)
√10mmol/L 4dNTP 混合液
40U/μl 的 RNase 抑制剂(如 RNasin, Promega)
20pmol/μl 特异性的 PCR 引物:正向引物、内部加尾正向引物、反向引物和内部反向引物(图 9.10.1)
1.5U/μl RNase H(如 Promega 公司)
√10×PCR 缓冲液(如 SuperTag 缓冲液,HT Biotechnologies)
5U/μl *Taq* 酶(AmpliTaq, Perkin Elmer)

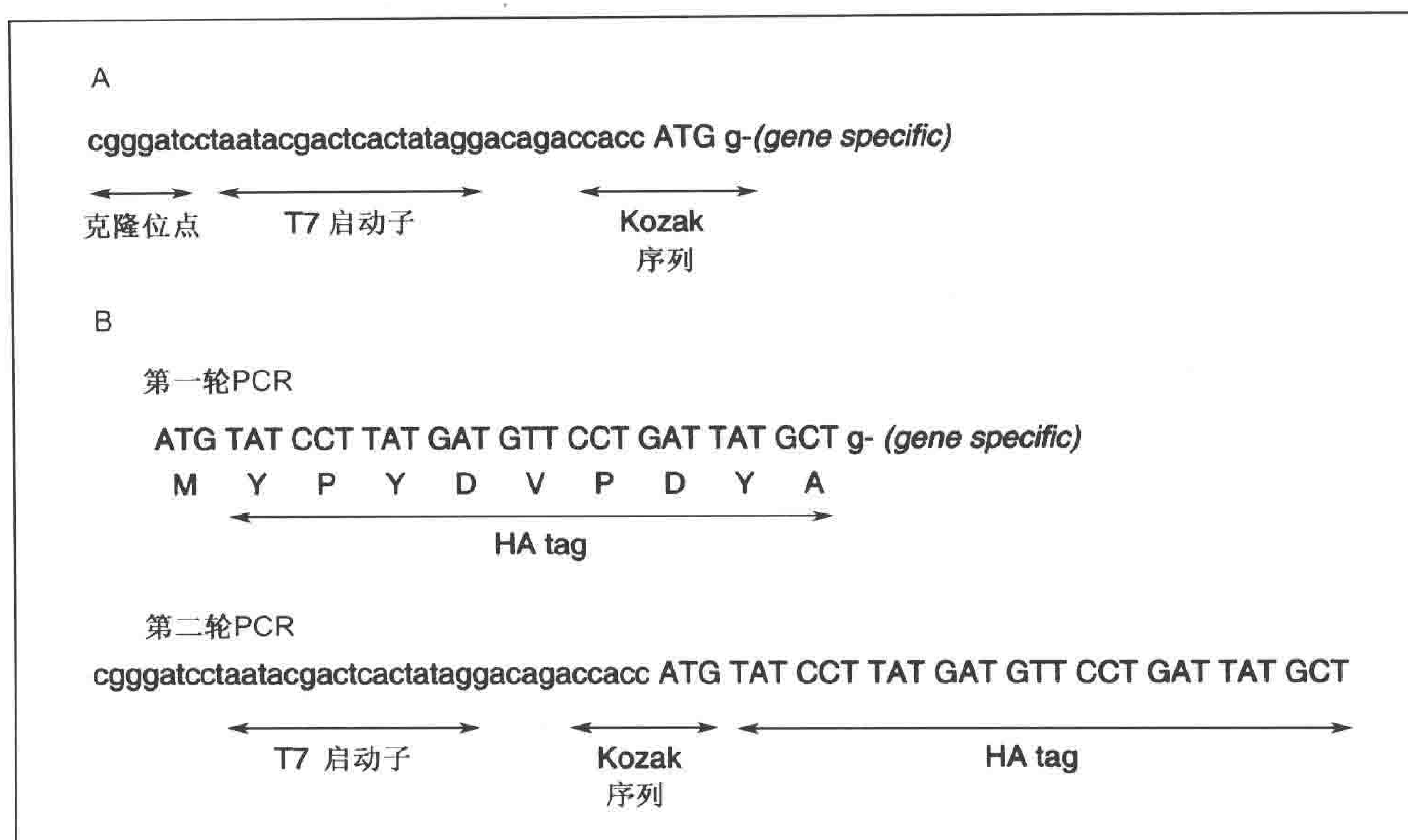


图 9.10.1　加 PTT 尾的引物序列及组成元件。A. PTT 正向引物：包含一个 T7 RNA 聚合酶启动子序列、间隔序列及 Kozak 转录起始序列。克隆位点可选择 5′*Bam*H Ⅰ或涵盖 ATG 起始密码子的 *Nco* Ⅰ。B. PTT 前向引物携带一个蛋白质 N 端标签 HA，在第一轮扩增中，HA 标签序列被扩增，在第二轮扩增中 HA 标签序列被连接到相应序列上。

非放射性蛋白质截短试验试剂盒（Roche Diagnostics 公司）包含下述组分：

对照 DNA（200ng/μl 人类基因组 DNA）
500ng/μl 5′对照引物
150 ng/μl 3′对照引物
4×转录混合液
T7 翻译混合液（如果需要可含生物素标记的赖氨酸）
25mmol/L 乙酸镁溶液
25mmol/L EDTA 溶液
灭菌无 RNase 水
Combi-marker（生物素加颜色标记；预染色的蛋白质分子 marker 也可以）
SDS 样品缓冲液

√30%（*m*/*V*）37.5∶1 丙烯酰胺/双丙烯酰胺
√1.5mol/L Tris·Cl，pH6.6
√10% SDS
10%（*m*/*V*）过硫酸铵（APS，新鲜配制）
N，*N*，*N*′，*N*′-四甲基乙二胺（tetramethylethylenediamine，TEMED）
√1.0mol/L Tris·Cl，pH6.8
√运行缓冲液
√电转缓冲液，冰预冷
PVDF Western blotting 膜（Roche Diagnostics 公司）或相当作用的膜

甲醇

Tris 盐缓冲液(TBS):50mmol/L Tris · Cl,pH7.5(见附录 1)/150mmol/L NaCl

10×顺丁烯二酸贮存液:1.0mmol/L 顺丁烯二酸(Fluka)/1.5mol/L NaCl,pH7.5

化学发光底物试剂盒(Roche Diagnostics 公司)包含:

　　化学发光底物溶液

　　启动溶液 B

　　封闭试剂

POD 偶联链霉亲和素(Roche Diagnostics 公司)

洗脱缓冲液:含 0.1%(V/V)Tween 20 的 TBS

抗 HA 高亲和力抗体(Roche Diagnostics 公司)

过氧化物酶偶联兔抗鼠免疫球蛋白(Dako)

灭菌巴氏德管

Perkin Elmer 2400、9600 或 9700 PCR 仪

SDS-PAGE 系统(如 Bio-Rad 的 Mini Protean Ⅱ),包括电转装置(Bio-Rad)

塑料托盘

Whatman 3MM 7cm×10cm 滤纸

保鲜膜

X-Omat AR 底片(Eastman Kodak)或荧光检测器(如 Roche Diagnostics 公司的 Lumi-Imager)

1. 取 1~3μg 乙醇中保存的 RNA,加 0.1 倍体积的 3mol/L 乙酸钠(pH5.6),12 000g 4℃离心 10min。
2. 用灭菌巴氏德管吸掉上层液体,空气中干燥,注意不要太干。

3a. 随机引物扩增:在上述 RNA 中加 2μl 0.5μg/μl 随机引物和 8.5μl 水(或两者事先的混合物 10.5μl 也可),混合后,65℃孵育 10min 后立即置冰上。

3b. 特异性引物(GSP)扩增:在空气干燥的 RNA 中加入 8.5μl 水和 2μl 10pmol/μl 的反向引物,混合,在 65℃孵育 10min 后立即冰浴。

4. 加入下列成分至总体积 20μl:
   反转录酶缓冲液 4μl;
   0.1mol/L DTT 2μl;
   10mmol/L 4dNTP 2μl;
   40U/μl RNasin 0.5μl;
   50U/μl 反转录酶 1.0μl。
   30℃孵育 10min,42℃孵育 60min。
5. 可选:准备 RNA 引物,加入 4U RNase H 37℃孵育 20min 用于第二链扩增(产物可储存于−20℃)。
6. 准备 25μl 第一轮 PCR 混合液 1:
   10mmol/L 4 dNTP1μl;
   第 5 步的 cDNA 2~4μl;
   基因特异性正向引物 20pmol;

基因特异性反向引物 20pmol；

加水至 25μl。

7. 准备 25μl 下述混合液 2：

10×PCR 缓冲液 5μl；

Taq 酶 0.5～2U；

加水至 25μl。

8. 加 25μl 混合液 2 至混合液 1，按下述参数进行第一轮 PCR 扩增（Perkin Elmer 2400、9600 或 9700 PCR 仪）：

起始步骤	2min	94℃
25～30 个循环	15s	93℃
	30s	55～60℃
	1min/kb	72℃
最终步骤	7min	72℃

将 PCR 产物储存于 4℃。

9. 准备 25μl 第二轮扩增混合液 1：

10×PCR 缓冲液 5μl；

Taq 酶 0.5～2U；

加水至 25μl。

10. 准备 25μl 第二轮 PCR 混合液 2：

10mmol/L 4dNTP 1μl；

加尾内部前向引物 20～30pmol；

内部反向引物 20～30pmol；

10×稀释或未稀释第一轮 PCR 产物 250～300ng DNA 1μl；

加水至 25μl。

11. 应用第 8 步的参数进行第二轮 PCR 扩增。

12. 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。注意任何片段大小的异常可能意味着：遗传重排或突变影响到 RNA 剪切，或 RT-PCR 过程中被基因组 DNA 污染。

13. 将下述成分加到 0.5ml PCR 管中：

50～500ng PCR 产物 1μl；

4×T7 转录混合物 1.25μl；

水 2.75μl。

30℃孵育 15min。

14. 可选：将 2.5μl 转录混合物进行 1%琼脂糖凝胶电泳，分析其转录效率。如果在 PCR 产物下有一条清晰可见的 RNA 条带则意味着是成功的。

15. 将 2.5μl 转录混合物（第 13 步）和 10μl 翻译混合物（生物素标记的赖氨酸），30℃孵育 60min，储存于－20℃。

16. 用水和乙醇清洁玻璃板和 Spacers，在制胶格中安装两个胶盒（附录 3F 的 Mini Protean Ⅱ 制胶系统）。

17. 准备下述混合液用于制备两份 10%的胶：

30%(*m*/*V*)37.5∶1 丙烯酰胺/双丙烯酰胺 3.3ml(可根据产物大小调节浓度);

1.5mol/L Tris·Cl,pH8.8 2.5ml;

水 4ml;

10% SDS 100μl;

APS 100μl;

TEMED 4μl。

18. 将上述混合液倒入准备好的两玻璃板之间,液面距小玻璃板上缘 2.5cm,小心将水加至胶液上,使两者之间形成一平整的液面。60min 后胶凝固。
19. 准备下述混合液用于制备两份堆积胶:

30%(*m*/*V*)37.5∶1 丙烯酰胺/双丙烯酰胺 670μl;

1mol/L Tris·Cl,pH6.8, 500μl;

水 2.7ml;

10% SDS 40μl;

APS 40μl;

TEMED 4μl。

20. 将玻璃板间的水去除,小心加入堆积胶混合液,小心插入梳子,注意不要留有气泡。等待 15min,让胶凝固。
21. 移走梳子,用水冲洗加样孔,将胶板安装到电泳槽上,加上电泳缓冲液。
22. 将 2μl 翻译产物和 12μl SDS 上样缓冲液混合,点离,PCR 仪上 95℃变性 4min。
23. 上样:包括样品、对照及 Makers。
24. 70V 电泳 15~30min。
25. 再将电压加至 120V 电泳 1~1.5h。
26. 分开玻璃板,取出胶,去掉堆积胶,将剩余胶置于冰预冷的电转缓冲液 5min。
27. 用甲醇冲洗 PVDF Western blotting 膜 1min,用电转缓冲液冲洗 5min。
28. 将胶从缓冲液中拿出,去除多余的液体。将一 7cm×10cm 的 Whatman 滤纸盖在胶上,轻压滤纸,赶走滤纸与胶之间的气泡。
29. 将电转缓冲液倒至塑料托盘中,将电转盒放在塑料托盘内,用电转缓冲液浸湿纤维垫和其他相关膜或垫,按下列步骤进行安装(注意不要留有气泡):

纤维垫;

两张 7cm×10cm 的 Whatman 3MM 滤纸;

胶(倒置安装);

电转膜;

一张 Whatman 3MM 滤纸;

纤维垫。

30. 将电转盒关紧并插入电转固定架内。将一冰盘放在装满电转缓冲液的缸中。
31. 120V、250mA 电转 1h。
32. 将膜取下,用 TBS 洗膜。

化学荧光检测

33a. 将膜置于 25ml 1×顺丁烯二酸溶液中或 2%的封闭剂中封闭，室温下 40min 或 4℃过夜。

34a. 加 5μl POD 偶联链霉亲和素至封闭液中，温和摇动室温下孵育 30min。

35a. 准备 5ml 检测溶液，即 5ml 发光底物和 50ml 溶液 B 混合，用前室温下避光保存。

36a. 用 50ml 洗涤缓冲液洗膜 4 次，每次 10min。

37a. 将光敏感底物溶液倒入一塑料托盘内，将膜浸入到溶液中，温和摇动 1min。

38a. 用保鲜膜将膜包起来，避免气泡。

39a. 将膜在 X 线底片上曝光或用荧光探测器检测转录产物的特征。

HA 标签的检测

33b. 将膜置于 25ml TBS 溶液中或 1%的封闭剂中封闭，室温下 1h 或 4℃过夜。

34b. 将封闭液减至 15ml，加 0.2μg/ml 的抗 HA 抗体，温和摇动室温下孵育 1h。

35b. 用 50ml 洗涤缓冲液洗膜 3 次，每次 5min。

36b. 加 1.3μg/ml 抗 Ig 过氧化物酶偶联抗体，室温下孵育 30min。

37b. 用 50ml 洗涤缓冲液洗膜 3 次，每次 5min。

38b. 将膜置于检测缓冲液(第 37a 步)孵育 1min。

39b. 用保鲜膜将膜包起来，避免气泡。将膜在 X 线底片上曝光或用荧光探测器检测转录产物的特征。

支持方案　RNA 的分离与分析

小心：硫氰酸胍具有刺激性，酚具有毒性，处理和使用时要小心。

注意：所有的 RNA 样品须在冰上操作。

材料(标√的条目参见附录 1)：

用 EDTA-包被的血液收集管(Greiner 公司)收集的患者血标本或在 75cm² 组织培养皿上培养的 80%～90%汇合度的细胞

Histopague-1077(Sigma 公司)

√PBS，pH7.8，灭菌后 4℃保存

放线菌酮(可选；Sigma 公司)

含硫氰酸胍和酚的 RNAzolB(Campro Scientific 公司)

氯仿

异丙醇

70%乙醇，4℃

100%乙醇，4℃

$T_{10}E_{0.1}$缓冲液，pH8.0：10mmol/L Tris·Cl/0.1mmol/L EDTA，pH8.0

1mol/L NaOH

SeaKem 琼脂糖(FMC 产品)

√灭菌 1×TBE 缓冲液
√10mg/ml 溴化乙锭
√3mol/L 乙酸钠(用乙酸将 pH 调至 5.6)
√甲酰胺上样缓冲液
RNA 大小和质量 marker
12ml 白盖试管
Beckman GS-6R 水平转头微离心机
灭菌细胞刮片
CEP 口腔刮板(Life Technologies 公司)

从患者血液中抽提 RNA

1a. 用 EDTA-包被的血液收集管收集 10ml 患者血标本。
2a. 各加 5ml Histopague-1077 至 2 个 12ml 的白盖离心管中，小心在 Histopague-1077 上加 5ml 血液，950*g* 室温下水平转子离心 20min(不用刹车，让转子自然停下)。
3a. 弃最上层(血清和血小板)，将第二层(白色层)即淋巴细胞层转移至 10ml 试管中，用 4℃灭菌 PBS 洗涤，550*g*、室温下水平转子离心 10min。
4a. 小心倒掉上清，轻轻拍打试管使剩下的液体重悬白色(有时候是红色)沉淀，冰浴，接下面第 5 步。

从培养的细胞中抽提 RNA

1b. 可选：收获前，将细胞培养于含 100μg/ml 放线菌酮的培养基中 4～8h。
小心：放线菌酮有毒，须在通风橱中配制。
2b. 当 75cm² 组织培养皿上细胞长至 80%～90%汇合度时，倒去培养基，小心用 4℃灭菌 PBS 洗涤细胞。
3b. 加 5ml PBS，将培养皿置于冰上，用灭菌的细胞刮板刮取细胞，将细胞转移至一新的 12ml 白盖试管中，再加 5ml PBS 至细胞培养皿再次刮取细胞。收集所有细胞。
4b. 550*g* 室温下水平转子离心 10min。小心倒掉上清，冰浴，接下面第 5 步。

从口腔细胞中抽提 RNA

1c. 要求患者用水漱口清洗口腔几次清除食物残渣(如咖啡或其他食物等)。
2c. 用灭菌 CEP 口腔刮板刮取口腔两侧黏膜收集细胞。
3c. 将 CEP 口腔刮板置于 Spin-Ease 提取管中，轻微离心。将刮板及管子一起置于一新的 1.5ml 试管中，立即加 1～1.3ml RNAzolB 至刮板，孵育 5min。
4c. 12 000*g* 离心 1min，接下面第 6 步。
5. 加 1.2ml RNAzolB 至沉淀(每 5ml 血液或 75cm² 组织培养皿的细胞加 1～1.3ml RNAzolB)。用 Tip 吹打细胞几次使其裂解，将裂解液转移至一 1.5～2.0ml 的微离心管中。
6. 每 1.0ml 裂解液加 0.1ml 氯仿，剧烈振摇 15s，冰浴 5min。
7. 12 000*g* 4℃离心 15min。

8. 小心转移上层清亮水相（0.6～0.7ml）至一新的微离心管中，加 1 倍体积的异丙醇，冰浴 15min（如果需要可储存于 4℃～20℃）。
9. 12 000*g* 4℃离心 15min。
10. 弃上清，用 200μl 70%乙醇洗涤 RNA 沉淀。
11. 12 000*g* 4℃离心 10min，小心弃上清，空气干燥（不要太干）。
12. 用 50μl $T_{10}E_{0.1}$溶解沉淀，加 120μl 100%乙醇后－80℃保存。
13. 小心清洗琼脂糖电泳槽，注意去除 RNase 的活性，用 1mol/L NaOH 浸泡 1h，再用灭菌水冲洗。
14. 用灭菌 1×TBE 缓冲液制备 1.5%（*m/V*）SeaKem 琼脂糖，其中加 10mg/ml 溴化乙锭至 0.2μg/ml 终浓度。
15. 取相当于储存样品的 5%～10%，加 3mol/L 乙酸钠（pH5.6）至终浓度为 0.3mol/L，12 000*g* 4℃离心 10min。
16. 小心弃上清，用 5μl 甲酰胺上样缓冲液溶解沉淀，将样品加至上样孔中，同时加 RNA-marker。
17. 电泳。用手提便携式 UV（紫外线）观察仪观察，对照 RNA-marker 估计 RNA 的浓度、质量（如 18S 和 23S rRNA 条带清晰可见）和有无 DNA 污染（在胶的上方有大的条带）。

备选方案　使用偶联转录/翻译法进行放射蛋白质截短实验

在体外，一个管中进行的偶联转录/翻译实验相对于非偶联方法来说要显得简单些（但控制更加困难）。使用该方法，作者成功地翻译出 160kDa 的蛋白质产物（来源于一 4kb 的序列），但是，该方法翻译出的副产物（背景产物）也相应显著地增加了。

材料（标√的条目参见附录 1）：

TnT T7-家兔网织红细胞体外转录/翻译偶联系统（Promega 公司）：
　　TnT T7 RNA 聚合酶
　　TnT 家兔网织红细胞裂解物
　　TnT 反应缓冲液
L-亮氨酸、L-甲硫氨酸和 L-半胱氨酸盐酸盐的混合物
含萤光素酶报告基因的质粒
萤光素酶
萤光素酶分析试剂
5mCi/ml[^{3}H]标记的亮氨酸（160Ci/mmol；Amersham 公司）
1.5U/μl RNase 抑制剂（如 RNasin；Promega 公司）
灭菌水
√2×SDS 样品缓冲液
分子 marker：^{14}C 标记（Amersham 公司）的或预染的（Bio-Rad 公司）蛋白质 marker
√染色液
二甲基亚砜（dimethylsulfoxide，DMSO）

DMSO /PPO(1mol/L 2,5-二苯　唑溶解于 DMSO 中,可反复使用 2 或 3 次),或其他放射自显影增强试剂(如 Amersham 公司的 Amplify、MEN Life Science 公司的 EN^3HANCE)

塑料盒

Whatman 3MM 滤纸

干胶仪

X-Omat AR 胶片(Eastman Kodak 公司)

1. 准备 cDNA(从患者 RNA 反转录后经过两轮扩增的 PCR 产物)或扩增的 DNA 样品(基本方案,第 1～12 步)。
2. 将 TnT T7-家兔网织红细胞体外转录/翻译偶联系统从 −70℃冰箱中取出,放置于冰上,将 TnT T7 RNA 聚合酶直接置于冰上,等融解后将所有其他成分都置于冰上。用手握法快速融解转录/翻译偶联系统。

   不要将 TnT T7 RNA 聚合酶放在冰上太长时间,反应系统准备好后尽可能快地将系统再次冻存。

3. 在一 1.5ml 的微离心管准备转录/翻译系统,同时用试剂盒的中荧光素酶质粒准备一个对照:

   家兔网织红细胞体外转录/翻译偶联系统 12.5μl ;

   TnT 反应缓冲液 1μl;

   TnT T7 RNA 聚合酶 0.5μl;

   氨基酸混合物 0.5μl;

   5mCi/ml[^{3}H]标记的亮氨酸 2μl;

   40U/μl RNasin 0.5μl;

   PCR 产物 50～500ng;

   加灭菌水至 25μl。

   混合后在 30℃孵育 60min(在 25～37℃不会太影响翻译效率)。

   在一个 12μl 反应体系中将 PCR 产物与 TnT 混合系统的比例控制在 1∶2 以下同样可以得到好的结果。

4. 在转录/翻译产物中加 1 倍体积的 2×SDS 样品缓冲液混合,储存于 −70℃。
5. 准备 SDS-PAGE 胶,用根据翻译产物的大小选择适当的蛋白质 marker,对反应产物进行电泳(基本方案,第 16～27 步)。
6. 电泳完后将胶转移至一塑料盒内,覆盖染色液,温和摇动孵育 15～30min。

   如果使用^{14}C 标记的蛋白质 marker,染色步骤可以省略。

7. 弃染色液,用脱色液反复冲洗胶块,直到蛋白质 marker 清晰可见。
8. 用水冲洗胶块 15min。
9. 用 DMSO 覆盖胶块温和摇动 10min,使胶块脱水。重复脱水一次。

   小心:DMSO 具有化学危险性,第 8～10 步中须在通风橱中进行。

10. 将胶置于 DMSO/PPO 中孵育 10min,共 2 次。
11. 用水冲洗胶块 10～15min 直到胶变白。
12. 将胶放在 Whatman 3MM 滤纸上,在干胶仪上干燥(60～70℃ 1h 以上)。

13. 用 X-Omat AR 胶片进行放射自显影(见 CPMB 附录 3A),在放射自显影图上检测翻译产物的特征,如果使用萤光素酶对照,则可在图上寻找 62kDa 的蛋白质条带。

通常情况下,在一个 12μl 反应体系中翻译 50ng 1.5kb 的 PCR 产物经过过夜(8h 以上)曝光后很容易在放射自显影图上检测到。

参考文献:den Dunnen and van Ommen, 1999; Roest *et al.*, 1993

编者:Rolf Vossen and Johan T. den Dunnen。

单元 9.11 载脂蛋白 E(apolipoprotein E, APOE)基因型分析:不同方法间比较

图 9.11.1 为 APOE 的不同基因型。

	$APOE_{112}$	$APOE_{158}$
E2	Cys	Cys
ε2	**TGC**	**TGC**
E3	Cys	Arg
ε3	**TGC**	**CGC**
E4	Arg	Arg
ε4	**CGC**	**CGC**

图 9.11.1 APOE 的基因型是利用其第 112 和 158 位密码子的多态来分型的(见加粗部分)

基本方案 RFLP 法分析 APOE 基因型

材料(标√的条目参见附录 1)

溶解于 TE 缓冲液(pH7.4,附录 1)的 3~5ng/μl gDNA(来自血液)

APOE 引物:

前向引物:5′-TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A-3′

反向引物:5′-ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC ACT GCC-3′

√100mmol/L 4dNTP 混合物(Roche;每 dNTP 浓度为 25mmol/L)

5U/μl Taq 酶(Roche)

二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)

含 15mmol/L $MgCl_2$的 10×PCR 缓冲液(Roche)

10U/μl *Hha* Ⅰ(Promega)

10×缓冲液 C(Promega)

低熔点琼脂糖(如 Fisher)

NuSieve 琼脂糖(FMC Bioproducts)

√10×TBE

√10mg/ml 溴化乙锭

√6×上样缓冲液

1. 设置 PCR 体系(按 25μl 体系计算)：

gDNA(用 3～5ng/μl gDNA) 15～25ng；

前向引物 12.5pmol；

反向引物 12.5pmol；

各 dNTP 6.25nmol；

Taq 酶 1.25U；

加 DMSO 至 10%终浓度；

1×PCR 缓冲液(含 15mmol/L $MgCl_2$)。

2. PCR 参数：

起始步骤：	10min	94℃(变性)
32 个循环：	30s	94℃(变性)
	30s	56℃(退火)
	1min	72℃(延伸)
最终步骤：	4min	72℃(延伸)

3. 在 25μl PCR 产物中加入 5U *Hha* Ⅰ 酶及缓冲液 C(终浓度为 1×)，37℃孵育 2～3h。

4. 配制 4%的琼脂糖胶：将 1.5g 低熔点琼脂糖和 4.5g NuSieve 琼脂糖溶解于 150ml 1×TBE 中，混合后微波炉中加热至琼脂溶解，加 150μl 10mg/ml 溴化乙锭(0.15mg)并混匀，立即倒入胶盒中，插入梳子(15～20 个上样孔)。

5. 胶凝固后，覆盖上 1×TBE，小心拔掉梳子，每个上样孔中加入 10μl 裂解 PCR 产物(第 3 步)和 2μl 上样缓冲液。

6. 125V 电压电泳 45min，通过片段长度分析 APOE 的基因型。

备选方案 1　反向杂交 APOE 基因图谱

材料

溶解于 TE 缓冲液(pH7.4，附录 1)的 3～5ng/μl gDNA(来自血液)

INNO-LiPA ApoE 试剂盒(Innogenetics 公司)包括：

ApoE 扩增缓冲液

ApoE 引物混合物

$MgCl_2$溶液

甘油

膜条

杂交缓冲液

严格冲洗液

变性液

底物偶合物

稀释偶合物

底物溶液

底物缓冲液

冲洗液

检测槽

Taq DNA 聚合酶(Roche)

振摇式 45℃水浴槽

高质量标准温度计

1. PCR 扩增体系(50μl 体系)：

   gDNA(用 3～5ng/μl gDNA) 15～25ng；

   扩增缓冲液 10μl；

   ApoE 引物混合物 10μl；

   $MgCl_2$溶液 10μl；

   甘油 10μl；

   Taq 酶 1U。

2. PCR 参数。

起始步骤：	5min	95℃(变性)
30 个循环	30s	95℃(变性)
	20s	60℃(退火)
	20s	72℃(延伸)
最终步骤	10min	72℃(延伸)

3. 在检测槽中混合 10μl PCR 产物和 10μl 变性液，室温下孵育 5min。

   下述实验步骤中的孵育、洗涤和冲洗步骤等，都在 1ml 的体积中进行，并始终置于水浴摇床中；同一个检测槽中，在先前的成分移走后才加后面的成分。

4. 混合变性 DNA 和配好备用的杂交缓冲液，将膜浸入其中 45℃(用标准温度计测量)30min。
5. 将膜置于 45℃(准确)的洗涤液中，第一次 10～20s，第二次 10min。
6. 室温下，将膜置于 1∶5(如 20%冲洗液/80%水)溶液中冲洗两次，每次 1min。
7. 加 1ml 1∶100 的偶联溶液至各检测槽，室温下孵育膜 30min。
8. 室温下，将膜置于 1∶5 的冲洗液中冲洗两次，每次 1min。
9. 将膜置于配好备用的底物溶液中，室温下孵育 1min。
10. 加 1ml 1∶100 的底物溶液至各检测槽，室温下孵育膜 30min。
11. 室温下用水洗膜两次，每次 3min。
12. 根据膜上条带的特征确定各自 APOE 的基因型。

备选方案 2　荧光偏振法(fluorescence polarization，FP)检测 APOE 的基因型

材料(标√的条目参见附录 1)

溶解于 TE 缓冲液(pH7.4，附录 1)的 3～5ng/μl gDNA(来自血液)

APOE 引物：

前向引物：5′-TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A-3′

反向引物：5′-ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC ACT GCC-3′

√40mmol/L 4dNTP 混合物（Roche；每 dNTP 浓度为 10mmol/L）

5U/μl *Taq* 酶（Roche）

二甲基亚砜（dimethylsulfoxide，DMSO）

含 15mmol/L $MgCl_2$ 的 10×PCR 缓冲液（Roche）

Exo-SAP-IT（USB）

扩增 SNP 的寡核苷酸引物（延伸反应）：

5′-GGC GCG GAC ATG GAG GAC GTG-3′（$APOE_{112}$）

5′-CGG CCT GGT ACA CTG CCA GGC-3′（$APOE_{158}$）

AcycloPrime-FP SNP 检测试剂盒（Perkin-Elmer Life Science）包括：

10×缓冲液

AcycloTerminator 混合物

AcycloPol DNA 聚合酶

96 孔板（MJ Research）

96 孔板 PCR 仪

80℃水浴箱

96 孔板荧光偏振检测设备（如 Perkin-Elmer Life Science 公司 Victor 系列）

1. 在 96 孔板中准备 PCR 扩增体系（30μl 体系）：

gDNA（用 3～5ng/μl gDNA）30～50ng；

APOE 前向引物 6pmol；

APOE 反向引物 6pmol；

各 dNTP 0.5nmol；

Taq 酶 1.25U；

DMSO 至终浓度 10%（*V/V*）；

含 1.5mmol/L $MgCl_2$ 的 1×PCR 缓冲液。

2. PCR 参数：

起始步骤：	10min	94℃（变性）
32 个循环：	30s	94℃（变性）
	30s	56℃（退火）
	1min	72℃（延伸）
最终步骤：	7min	72℃（延伸）

3. 每孔转移 5μl PCR 产物至一新的 PCR 板中，加 2μl Exo-SAP-IT，37℃孵育 1h。

4. 80℃孵育 15min 使 Exo-SAP-IT 失活。

5. 在一 96 孔板中设置两个 APOE SNP 位点的延伸反应（20μl 体系）：

244bp PCR 产物（第 4 步）7μl；

扩增 SNP 的寡核苷酸引物（$APOE_{112}$ 或 $APOE_{158}$）50pmol；

10×缓冲液 2μl；

AcycloTerminator 混合物 1μl；

AcycloPol DNA 聚合酶 0.05μl。

6. PCR 参数：

起始步骤：	2min	95℃(变性)
x 个循环：	15s	95℃(变性)
	30s	55℃(退火)
最终步骤：	2min	15℃(冷却)

x：$APOE_{112}$ 为 30 个循环，$APOE_{158}$ 为 60 个循环。

7. 4℃ 150g 离心。

8. 96 孔板荧光偏振检测设备上检测。

备选方案 3　SNaPshot 分析法检测 APOE 基因型

SNaPshot 分析法所用的引物不同于基本方案所用的引物，因为该方案来自不同的实验室。

材料(标√的条目参见附录 1)

溶解于 TE 缓冲液(pH7.4，附录 1)的 3～5ng/μl gDNA(来自血液)

APOE 引物：

前向引物：5′-CCA AGG AGC TGC AGG CGG CGC A-3′

反向引物：5′-GCC CCG GCC TGG TAG ACT GCC A-3′

√100mmol/L 4dNTP 混合物(Roche；每 dNTP 浓度为 25mmol/L)

5U/μl Taq 酶(Roche)

二甲基亚砜(DMSO)

含 15mmol/L $MgCl_2$ 的 10×PCR 缓冲液(Roche)

QiaQuick DNA 纯化试剂盒(Qiagen)

测序引物：

5′-CGG ACA TGG AGG ACG TG-3′($APOE_{112}$)

5′-TTT TTT TTT TCC GAT GAC CTG CAG AAG-3′($APOE_{158}$)

SNaPshot 混合物(包括荧光标记[F]ddNTP；Applied Biosystems)

牛小肠碱性磷酸酶(Calf intestinal phosphatase，CIP；New England Biolabs)

DNA ladder(GeneScan-120LIZ，Applied Biosystems)

Hi-Di 甲酰胺(Applied Biosystems)

96 孔板或 384 孔板(MJ Research)

75℃水浴箱

ABI PRISM 3100 测序仪(Applied Biosystems)

GeneMapper 2.0 或 GeneScan 软件(Applied Biosystems)

1. 在 96 孔板或 384 孔板中准备 PCR 扩增体系(25μl 体系)：

gDNA(用 3～5ng/μl gDNA) 30～450ng；

APOE 前向引物 4pmol；

APOE 反向引物 1.4pmol；

各 dNTP 5nmol；

Taq 酶 0.5U；

DMSO 至终浓度 10%(V/V)；

含 1.5mmol/L $MgCl_2$的 1×PCR 缓冲液。

2. PCR 参数。

起始步骤：	10min	94℃(变性)
35 个循环	30s	94℃(变性)
	30s	60℃(退火)
	30s	72℃(延伸)
最终步骤：	10min	72℃(延伸)

3. 用 QiaQuick DNA 纯化试剂盒去除多余的 dNTP 和引物。

4. 在 96 孔板或 384 孔板中准备测序扩增体系(10μl 体系)：

217bp PCR 产物(第 3 步) 1μl；

测序引物($APOE_{112}$或 $APOE_{158}$) 2pmol；

10×缓冲液 2μl；

SNaPshot 混合物 5μl。

5. 扩增参数：

25 个循环：	10s	96℃(变性)
	5s	50℃(退火)
	30s	60℃(延伸)

6. 为减少未结合[F]ddNTP 的干扰，扩增产物中加 2.5μl CIP，于 37℃孵育 1h。

7. 75℃水浴 15min 使 CIP 失活。

8. 加入 DNA Ladder 和 HI-DI 甲酰胺于 SNaPshot 产物中，并于 ABI PRISM 3100 测序仪上扫描。

9. 用 GeneMapper 2.0 或 GeneScan 软件鉴定和确认 APOE 的基因型。

96 孔板荧光偏振检测设备上检测。

参考文献：Eichner *et al.*，2002；Mayeux *et al*，. 1998

编　　者：Martin Ingelsson，Youngah Shin，Michael C. Irizarry，Bradley T. Hyman，Lena Lilius，Charlotte Forsell，and Caroline Graff

第 10 章　癌基因组学

近年来分子遗传学的进展已经证实癌是一种遗传病——并非都可以遗传，但都有体细胞遗传物质的改变。遗传学上的研究已经为我们解释恶性肿瘤的发病机制做出了巨大的贡献，而且它还在不断的发展以提供诊疗手段。本章所讲到的方法涉及临床所运用的遗传学分析。

单元 10.1 提供了多种对癌症患者的血液标本的细胞进行遗传学分析的实验方法。由于研究方便，白细胞很久以来一直被用来分析染色体重组。观察到标志性重组染色体，如费城染色体（Ph 染色体）有助于诊断和后续治疗。许多肿瘤特异性的标志染色体已经在白血病中被发现，它们的发现对于在早期选择适合的治疗方案非常重要。细胞遗传学分析还用于对骨髓移植后的移植物分型。

对实体瘤进行染色体分析在技术上比较困难，所以对于它们的肿瘤特异性的重组染色体知之较少。然而，随着细胞培养方法和制备染色体分析的细胞样品的手段的进步，实体瘤的染色体分析已取得了很大的进展。

单元 10.2 讲到了收获分裂中期细胞的方法和对实体瘤培养物进行染色体分析的方法。这些方法在鉴别组织学上非常相似的肿瘤（如 Ewing 肉瘤和成神经细胞瘤）方面非常有效。随着技术的改进，实体瘤的细胞遗传学分析有望在临床上发挥更大的作用。

能够在分子水平识别基因的改变有望改进临床上对癌症患者病情的评估方法。分子水平的检测避免了对细胞培养技术的依赖，而且可以在少量的样品中检测到微量的恶性细胞。

单元 10.3 中将会讲到白血病和淋巴瘤的病例在分子水平上检测重组的方法。肿瘤特异性的转位造成拼接在一起的区域通常原来在基因组中相距甚远，PCR 分析就是基于此而设计的，能够检测到部分的转位现象。分析免疫球蛋白和 T 细胞受体基因可以提供信息以确定癌细胞的克隆来源，并且可用于监测癌症的复发。

单元 10.4 谈到在分子水平癌基因的扩增。癌基因的扩增涉及基因组片段十几倍甚至几百倍的重复。它是原癌基因激活的方式之一，而且往往与高恶性度和恶性进展较快有关。

最新的证据表明恶性进展是受损基因的累积造成的，它是一个多阶段的过程。可以想像，研究这些变化将有助于癌的诊断，而且最终会为发现更为特异性的治疗方案提供线索。

除了遗传的或者获得性的癌相关的基因突变外，还有一些其他形式的遗传物质的改变也会导致恶性表型。

单元 10.5 将提到用 PCR 来分析 DNA 甲基化的方法。这种方法可以运用于对基因组中任何位置的 CpG 甲基化的分析，也可用于检测肿瘤患者的基因改变以及介入被印的基因的固定遗传障碍的研究。

编者：Bruce R. Kort

单元10.1　收获分裂中期的细胞对恶性肿瘤患者的血液标本进行细胞遗传学分析

表10.1.1总结了主要的恶性肿瘤的血液标本以及依据不同的标本所对应的细胞培养方法。

表10.1.1　细胞培养方案的选择[a]

疾病	标本	培养类型	操作方案
ALL、AML和MDS	骨髓或大于30%每搏输出量的外周血	24h，不诱导	基本方案
CML	骨髓或外周血	24h，不诱导	基本方案
CLL	骨髓或外周血	24h，不诱导；加入PWM诱导培养3d	备选方案1
MM	骨髓或外周血	24h，不诱导；加入IL-4诱导培养5d	备选方案2
淋巴瘤	淋巴结	24h，不诱导	备选方案3
淋巴瘤	脾组织	24h，不诱导	备选方案4

a 缩写：ALL，急性淋巴细胞白血病；AML，急性粒细胞白血病；CLL，慢性淋巴细胞白血病；CML，慢性粒细胞白血病；IL-4，白细胞介素4；MDS，骨髓增生不良综合征；MM，多发性骨髓瘤；PWM，美洲商鹿有丝分裂原。

说明：所有与活细胞接触的试剂必须经过灭菌。除特殊说明外所有的培养都是在37℃含5% CO_2 的潮湿环境下进行。

基本方案　从骨髓和白血病血液样品中提取染色体

材料（标√的条目参见附录1）

√完全培养基A
√完全培养基B
骨髓或血液样本抽出后收集于含有不含防腐剂的肝素的注射器或Vacutainer管中
骨髓培养基（如Life Technologies，Sigma），可选
√加入了500mg/ml ethidium bromide（Sigma）的HBSS（见HBSS说明书）10mg/ml秋水仙素
0.075mol/L KCl溶液，新鲜配制，置于37℃
3∶1（*V/V*）甲醇/冰乙酸固定剂新鲜配制并密封（可在数小时内稳定）
50ml组织培养瓶（Falcon）
15ml培养管
台式离心机
37℃ 5% CO_2 培养箱
15ml离心管（Coming）
85～95℃烤箱或微波炉（对于STAT病历）
巴斯德吸管
洁净的载玻片（金属包装；Becton Dickinson）
相差显微镜

1. 在层流通风橱中将两个 50ml 细胞培养瓶标注以下信息：患者序列号、患者姓名、日期、实验开始时间、A 或 B 培养基。
2. 向标注 A 的培养瓶中加入 10ml 完全培养基 A，向另外一个瓶中加入 10ml 完全培养基 B。如果样品量不足可以只选择一种培养基。
3. 用网垫去除注射器或试管的盖子，将样品转移到经过灭菌处理的 15ml 培养瓶中。如果是运输来的样品在培养基中会含有肝素锂，存放在紫色盖子的试管中含有 EDTA，需要用 10ml 骨髓培养基洗两次，每次室温下 250*g* 离心 10min。
4. 向每个培养瓶中加入 0.6～0.8ml 骨髓或者 1.0ml 白血病患者的血液，拧松瓶盖，涡旋混匀。如果白细胞计数超过 100 000 个细胞，只加入 0.1～0.2ml 骨髓，如果白细胞计数少于 1000 个细胞则需加入 0.9ml 骨髓。
5. 37℃培养 15～24h。将培养物转移到 15ml 离心管中。每管加入 100μl 含 500mg/ml 溴化乙锭的 HBSS，轻柔混匀。37℃静置 1～2h。每管加入 100μl 10mg/ml 秋水仙酰胺，轻柔混匀。37℃静置培养 20～45min。
6. 室温下 250*g* 离心 10min。弃上清。轻轻拍打管壁或轻柔涡旋以重悬沉淀，要确保管底没有残余沉淀。
7. 向每管轻轻地逐滴加入 10ml 预热的 0.075mol/L KCl 溶液，盖上盖子，缓慢地来回颠倒使其充分混匀。37℃静置 15～20min。
8. 每管逐滴加入 1ml 体积比为 3∶1 混合的甲醇、冰乙酸固定液。盖上盖子，缓慢颠倒混匀。室温下 250*g* 离心 10min。弃上清，重悬沉淀。缓慢加入 10ml 的 3∶1 甲醇/冰乙酸固定液。盖上盖子，室温下静置超过 10min。
9. 室温下 250*g* 离心 10min。弃上清并重悬沉淀。缓慢地逐滴加入 3∶1 甲醇/冰乙酸固定液。盖上盖子缓慢颠倒混匀。再重复两次。将已固定的细胞置于 4℃保存。

10a. 对于 STAT 病例：保存过夜后，对玻片进行预处理，将玻片置于 85～95℃烤箱中加热 1.5～2h 或置于微波炉中加热 3.5～4.5min。玻片充分冷却后，进行吉姆萨胰蛋白酶显带（单元 4.3），将胰蛋白酶消化的时间缩短约 10s 以保持玻片的新鲜。

10b. 对于其他病例：室温下静置 15min。室温下 250*g* 离心 10min。弃上清。每管以 0.5～3ml 新鲜 3∶1 甲醇/冰乙酸固定液重悬。加入足够地固定液使得悬液呈薄雾状。

11b. 将少量悬液吸入巴斯德吸管中。悬液不得超过吸管中段，因为超出的部分不易被打出。从 12.7（5in）～61cm（2ft）向清洁的载玻片中滴下 4 或 5 滴悬液。

由于实验室的环境在温度和湿度上各不相同所以最好试用多种方法以确定什么样的玻片比较好：是湿的或干燥的，是预冷的或是室温的。

12b. 检查玻片的数目，用相差显微镜检查染色体的分散度。如果分散度不够则可参考表 10.1.2（或单元 4.1）中所介绍的方法进行调节。制作 4 张玻片，每种培养各 2 张。在 85～95℃烤箱中烘干玻片。

表 10.1.2　染色体制备疑难解析

问题	可能的原因	解决方案
无中期分裂相或中期分裂相过少	生长状态差	核查样品的类型和疾病的诊断
	样品不合适(如血液样品少于每搏输出量的 30%)	重新取样
	血液凝固	增加肝素用量或将其与样品充分混匀
	样品过期	缩短从取样到开始培养的时间
	骨髓细胞减少	增加取样量
	缺乏有丝分裂源的刺激	重新制备加入适当的丝裂源
	试剂不新鲜或配制错误	校正所用的试剂
	培养温度不对	校正培养温度
染色体过度分散	收获时细胞破裂	减慢加入低渗液和固定液的速度
	制片过程中细胞破裂	降低滴片时的高度,使用预冷的干燥的玻片延长干燥时间
	低渗时间太长	缩短低渗时间
看得到胞浆	低渗时间不够长	延长低渗时间
	制片过程中脱水不充分	在冰箱中固定过夜或增加固定的次数
染色体浓缩	有丝分裂阻断剂处理时间过长或者浓度过高	缩短有丝分裂阻断剂的处理时间,降低其浓度
	收获过程没有用溴化乙锭处理	加入溴化乙锭
	溴化乙锭处理时间不够	延长溴化乙锭处理时间
	大部分细胞不在分裂前中期	延长或缩短静置或培养时间
染色体过度伸展	收获过程中溴化乙锭或秋水仙素处理时间过长	缩短溴化乙锭和(或)秋水仙素处理时间
	干燥过快	缩短干燥时间;使用预冷干燥的玻片
很多染色体堆积在一起	收获过程中溴化乙锭处理时间过长	缩短溴化乙锭处理时间
	溴化乙锭溶液浓度过高	降低溴化乙锭浓度
	低渗时间不够	延长低渗时间
	收获过程中固定不佳	低渗后逐滴加入固定剂
	固定不充分	增加固定的次数
	玻片上细胞太多	减少向玻片上滴细胞悬液的量 用固定剂稀释细胞悬液
	制片时伸展不佳	玻片尽量低温干燥;增加滴片时的高度;在干燥的过程中向玻片吹气

备选方案 1　以慢性淋巴细胞白血病患者的骨髓和外周血样品制备分散的染色体标本

附加材料（见基本方案；标√的条目参见附录 1）

√美洲商鹿有丝分裂原（PWM）：LECTIN-Phytolacca American Lectin（Sigma）reconstituted with 5ml HBSS 置于－20℃保存（HBSS 说明书）

1. 按上述方法进行骨髓和外周血的培养（基本方案，第 1 步～第 4 步），如下所述共培

养 4 瓶：两瓶分别以完全培养基 A 和 B 培养 24h，不诱导；两瓶分别以完全培养基 A 和 B 培养 3d，以 PWM 进行诱导。

2. 向准备进行 3d 诱导培养的培养瓶中加入 PWM，用量为 0.3ml/10ml 完全培养基（A 或 B），轻轻混匀，拧紧瓶盖。4 瓶均置于 37℃进行培养。
3. 收获细胞（3d 培养的培养物省略溴化乙锭处理的过程），按照前述方法固定、制备分散染色体标本（基本方案，第 5～12 步）。

备选方案 2　以多发性骨髓瘤患者的骨髓和外周血样品制备分散的染色体标本

附加材料（基本方案）

含 1μg/500μl 白细胞介素 4（IL-4，Sigma）的 RPMI（Life Technologies；Irving Scientific），分装为 100μl/管置于－20℃保存。

1. 按上述方法进行骨髓和外周血的培养（基本方案，第 1～4 步），如下所述共培养 3 瓶：两瓶分别以完全培养基 A 和 B 培养 24h，不诱导；一瓶分别以完全培养基 A 或 B 培养 5d，以 IL-4 进行诱导。
2. 向进行 5d 培养的瓶中加入 100μl IL-4 in RPMI，轻柔混匀，拧紧瓶盖。3 瓶均置于 37℃进行培养。
3. 收获细胞（3d 培养的培养物省略 ethidium bromide 处理的过程），按照前述方法固定、制备分散染色体标本（基本方案，第 5～12 步）。

备选方案 3　以淋巴结样品制备分散染色体标本

附加材料（基本方案；标√的条目参见附录 1）

淋巴结样品
骨髓培养基（如 Life Technologies，Sigma）
√胶原酶溶液
5ml petri 皿，60mm×15mm（Falcon）
小刀

1. 在 5ml petri 皿上标明以下信息：序列号、患者姓名、实验开始日期和时间。
2. 用小刀或吸管将淋巴结标本移入标记好的 petri 皿中。切碎标本直至没有大块残余。加入少量骨髓培养基以保持样品湿润。
3. 向皿中加入以下试剂：

   4.0ml 骨髓培养基；
   1ml 胶原酶溶液；
   8ml 秋水仙素。
   轻柔混匀，37℃培养 15～24h。
4. 将样品转移到离心管中，按前述步骤收获细胞、固定、制备分散的染色体标本（基本方案，第 6～12 步）。

备选方案 4　以脾组织样品制备分散的染色体样本

附加材料（基本方案；标√的条目参见附录 1）

脾组织样品
√胶原酶溶液
5ml petri 皿 60mm×15mm（Falcon）
小刀

1. 在 5ml petri 皿上标明以下信息：序列号、患者姓名。用小刀或吸管将淋巴结标本（<3mm）移入标记好的 petri 皿中。踩碎或切碎标本直至没有大块残余。如果仍有块状物残留则加入 0.5ml 胶原酶溶液。
2. 在两个 50ml 组织培养瓶上表明以下信息：患者序列号、患者姓名、日期、实验开始时间和 A 或 B 以标志是使用的哪种培养基。向相应的培养瓶中加入 10ml 完全培养基 A 和 B。
3. 将样品的一半分别转移到培养瓶中 37℃培养 15～24h。将培养物转移到离心管中离心收获细胞，固定、制备分散的染色体标本（基本方案，第 6～12 步）。

互联网资源

http：//cgap. nci. nih. gov/Chromosomes/Mitelman

参考文献：ISCN，1991；Jaffe，2001；Sandberg，1990

编者：Paola Dal Cin

单元 10.2　实体瘤培养分裂中期细胞的收获和细胞遗传学分析

注意： 所有与活细胞接触的试剂和设备必须经过灭菌处理。除特殊说明外所有的培养都在 37℃含 5% CO_2 的潮湿环境下进行。

基本方案　对来源于实体肿瘤、淋巴瘤的分裂中期的细胞进行细胞遗传学分析

材料

10μg/ml 秋水仙酰胺（GIBCO/BRL）
于 25cm 组织培养瓶、5ml 培养基中生长状况良好的肿瘤细胞培养物（支持方案，第 1～3 步）
1×胰蛋白酶/EDTA（GIBCO/BRL），仅对于单层细胞培养
0.067mol/L KCl
固定液：3∶1（V/V）甲醇/冰乙酸，新鲜配制
15ml 离心管

倒置显微镜，仅对于单层细胞培养

离心机：Fisher Marathon 21K，Becton Dickinson Primary Care Dynac Ⅱ，或功能相似的其他机型

60℃或70～75℃玻片加热器

1. 向生长状态良好的肿瘤细胞培养物中加入10μl 10μg/ml的秋水仙酰胺（终浓度0.02μg/ml）。对于生长缓慢的培养物则要使终浓度达到0.04～0.06μg/ml。静置15～18h。

2a. 对于单层（贴壁生长）的细胞：当细胞生长至汇合度达80%左右时将培养基转移到15ml离心管。向培养瓶加入2ml胰蛋白酶/EDTA，短暂摇匀移入离心管。再向培养瓶中加入新鲜的胰蛋白酶/EDTA静置5min。倒置显微镜下观察细胞。剧烈拍击瓶壁以使所有的贴壁细胞脱离瓶壁。如果仍有贴壁的细胞则再静置5～10min。将所得细胞悬液移入离心管。

2b. 对于悬浮生长的细胞：1d内将培养的细胞及培养基一同转移到15ml离心管。

3. 室温下300*g*离心10min，弃上清，拍打管壁使细胞沉淀分散。以7ml 0.067mol/L KCl重悬细胞并静置2min。向管中加入7滴固定液，颠倒混匀数次。300*g*离心10min，弃上清。拍打使沉淀松散，以7ml固定液重悬，静置于－20℃≥1h（不超过4周）（对于用奎纳克林染色的中期细胞则选择冷凝；单元4.3）。

4. 300*g*离心10min，弃上清，以7ml新鲜固定液重悬。再次离心并以数滴新鲜固定液重悬。制备分散染色体标本（单元4.1），根据具体情况调节温度和湿度。如果染色体分散不良并且聚集在胞浆中则将低渗步骤改为静置于0.067mol/L KCl中10min。将玻片置于60℃玻片加热器上≥24h或70～75℃加热器上1h。

5. 以GTG显带技术染色（单元4.3）。如果用的是70～75℃玻片加热器则缩短胰蛋白酶处理时间50%。

6. 分析从造形术人口和至少一二倍体分裂中期的10或更多分裂中期建立固定的分型。如果标本中中期细胞很少则用2～3倍的秋水仙酰胺（终浓度0.04～0.06μg/ml）处理过夜重新收获中期细胞。

支持方案1　将实体肿瘤的细胞分散并培养

附加材料（基本方案；标√的条目参考附录1）

肿瘤标本（任一种实体癌肿、肉瘤、生殖细胞或神经瘤）

√肿瘤运输溶液（室温）

√加入了15%FBS（体积比）的RPMI完全培养基补加两性霉素至2.5μg/ml（该培养基4℃保存不超过1个月），培养基预热到37℃

√10 mg/ml胶原酶

灭菌手术刀片

$25cm^2$组织培养瓶

1. 将手术取出的肿瘤标本立刻放入肿瘤运输溶液中，尽可能快地送到实验室。如果不能立即进行分散则将肿瘤标本放在肿瘤运输溶液中于4℃保存不超过12h。

2. 用手术刀片将标本切割成小于 1mm³ 的小块。加入 5～10ml 预热的含 1mg/ml 胶原酶的加入了抗生素的 RPMI/FBS 完全培养基，静置过夜。
3. 反复吹打肿瘤胶原酶混合物以分散细胞团，接着以 300*g* 离心 10min。弃上清，用不含胶原酶的加入了抗生素的培养基重悬沉淀。
4. 取 2ml 悬液接种到 25cm² 组织培养瓶，在倒置显微镜下观察。调整接种的细胞悬液的量使得单细胞和细胞团能占据培养瓶底面的 25%～50%。将剩下的细胞悬液分别接种到另外的培养瓶中，如果可能接种至少 3 个培养瓶。补加不含胶原酶的加入了抗生素的培养基使得终体积达到 5ml。静置培养。

   增强型的 RPMI/15%FBS 培养基能够促进约 25%实体肿瘤短期生长，它含有 0.25%（体积比）抑肽酶（Sigma），1%（体积比）牛垂体后叶素提取物（Collaborative Biomedical）和 0.5%（体积比）Mito＋血清（Collaborative Biomedical）。这种增强型培养基不能用于分散细胞（第 2～3 步）。

5. 每日用相差显微镜观察培养物中哪种类型的细胞增殖。当培养基开始变黄时要及时更换。如果发现培养的细胞是成纤维细胞则终止培养。当培养的肿瘤细胞生长活跃并覆盖到培养瓶面积的 80%（一般在 4d 内），按照前述方法（基本方案）收集细胞中期分裂相。

支持方案 2　培养淋巴结（淋巴瘤）标本用于细胞遗传学分析

这种细胞遗传学方法适用于所有淋巴系肿瘤，包括霍其金氏病和非霍其金氏病。

附加材料（基本方案；标√的条目参见附录 1）

淋巴结标本
√肿瘤转移溶液，预冷
√加入了 2.5μg/ml 两性霉素的完全 RPMI/15%（*V*/*V*）FBS 培养基（4℃保存不超过 1 个月），预热至 37℃
√10mg/ml 胶原酶
聚蔗糖（Sigma）
√HBSS
0.075mol/L KCl
25cm² 组织培养瓶或 60mm 圆形培养皿

1. 将手术取出的淋巴结标本放入预冷的肿瘤转移溶液，置于 4℃ 1～6h。
2. 将淋巴结标本分割成小于 1mm³ 的小块，加入 5ml 预热的加入了 1mg/ml 胶原酶的完全 RPMI/15%（*V*/*V*）FBS 培养基。静置 30min。
3. 小心地将上述瘤组织悬液转移到 15ml 离心管中，铺在 5ml 聚蔗糖上。700*g* 离心 20min。用灭菌过的移液器头小心地将聚蔗糖/胶原酶界面层（一层白不透明的单核细胞）吸出，允许吸出 1～2ml 周围的聚蔗糖和胶原酶。
4. 向单核细胞中加入 10ml HBSS，300*g* 离心 10min。去上清，用 5ml 不加胶原蛋白酶（collagenase）的完全 RPMI/15%（*V*/*V*）FBS 培养基重悬单核细胞沉淀，转移到 25cm² 组织培养瓶或 60mm 圆形培养皿，加入至终浓度为 0.01μg/ml。培养过夜。

5. 按照前述方法（基本方案，第 2b 步）收集细胞中期分裂相，将其步骤中 KCl 浓度改为 0.075mol/L。

支持方案 3　制备渗出物（体液）标本用于细胞遗传学分析

附加材料（基本方案；标√的条目参见附录 1）

恶性渗出物标本
10μg/ml 长春碱（Lilly）
10mg/ml 溴化乙锭，于暗色或锡箔纸包裹的瓶中 4℃储存
√加入了 2.5μg/ml 两性霉素的完全 RPMI/15%（V/V）FBS 培养基（4℃保存不超过 1 个月），预热至 37℃
0.85%（m/V）氯化铵，仅对于血液样本
50ml 离心管
25cm² 组织培养瓶

1. 迅速将取出的体液标本在其自然冷却到室温前转移到实验室。将 30ml 体液标本加入到 50ml 离心管中并向其中加入 150μl 10μg/ml 的长春碱和 30μl 10mg/ml 的溴化乙锭。静置 1h，按照前述方法（基本方案，第 2b 步）收集细胞中期分裂相。如果可能则同步多管收集。
2. 如果可能则在直接收集中期分裂相的同时（收集工作进展到上述将恶性体液标本加入到 50ml 离心管中静置）建立同步多瓶培养。300g 离心 15min，去上清液。
3. 如果细胞沉淀有血色，则用 10ml 0.85%氯化铵重悬，将悬液转移到 15ml 离心管。室温静置 15min，300g 离心 10min，去上清液。细胞沉淀不呈血色的则省略这一步。
4. 每一管细胞沉淀用 5ml 预热的加入了 2.5μg/ml 两性霉素的完全 RPMI/15%（V/V）FBS 培养基重悬，加入到 25cm² 培养瓶里。用倒置显微镜观察细胞。其余管沉淀则重悬到其他培养瓶中，做到每一个培养瓶中加入的细胞数不同，并且当细胞贴壁后达到 30%～75% 的汇合度。静置培养，当培养基开始变黄时更换培养基。
5. 当培养的肿瘤细胞生长活跃并覆盖到培养瓶面积的 80%（一般在 2～5d 后），按照前述方法（基本方案）收集细胞中期分裂相。

参考文献：Harrison，1992；Mandahl，1992；Mitelman，1991；Sandberg，1990
编者：Jonathan Fletcher

单元 10.3　分子生物学方法分析白血病和非霍奇金氏淋巴瘤的 DNA 重组

策略

克隆抗原受体重组出现于大多数淋巴瘤细胞，因此该标记被用于第 1 步淋巴组织活检。易位则用于第 2 步检查，对肿瘤进行分型。对于组织学和其他结果预示有特殊移位存在的情况可以直接检测易位。抗原受体重组不适用于大多数非淋巴细胞白血病，在这

些病例中染色体易位是唯一适合的分子标记。

Southern杂交是检测免疫球蛋白基因（重链基因和κ、λ轻链基因）和TCR-β和γ链基因的最可靠方法。只要适当的DNA检测可以进行，应按照基本方案1对所有的5个基因进行检测以确定克隆形成能力，因为增殖的认为是T细胞或B细胞的细胞有可能含有来源于其他细胞系的细胞。对于不同抗原受体基因的测试可以同时开展，如果DNA有限，Southern印迹可以对于使用同种限制性内切核酸酶分析的基因重复杂交。

PCR分析一些抗原受体基因的克隆重排（备选方案1和2），在一定的情况下也可以用做免疫球蛋白重链基因和TCR-Γ和δ链基因重排：当可用的DNA是有限的，样本中不规则的细胞数量很小以及抗原受体基因克隆重排的快速廉价筛选测试，尤其是那些免疫球蛋白重链基因的克隆重排被要求时。然而因为PCR不能检测出所有可能的免疫球蛋白重链基因克隆重排，所以PCR不能作为决定性的分析方法。

DNA印迹杂交只能在断裂点处于不超过25kb DNA区域的情况下用做检测染色体易位。对于具有更紧密的断裂点簇的易位，PCR可能是一种更快、更廉价的检测方法。PCR的敏感度是DNA印迹杂交的3倍。由于敏感度是监视治疗后的后遗症的首要的重要指标，PCR是检测后遗征唯一的选择。由于联合易位的断裂点是广泛散布在DNA上的，所以可能需要用到反转录PCR（基本方案2）。

注意：PCR要求特殊预防措施防止污染。必须熟悉标准方法。

注意：涉及RNA的实验要求仔细的操作来避免RNA降解。用二乙基焦磷酰胺（DEPC）处理过的水来配制所有溶液。

基本方案1　用DNA印迹杂交检测克隆抗原受体基因重排

DNA印迹杂交同样能检测出免疫球蛋白重链基因（重链和κ、λ轻链）或者T细胞受体基因（β和γ链）。

附加材料（基本方案；标√的条目参见附录1）

10μg DNA样品（附录3A）
适当的限制性内切核酸酶（表10.3.1）和缓冲液
10μg正常和重排控制DNA（如胎盘和瘤DNA，分别地）
√6×gel加样缓冲液
分子大小标准参照物（如λDNA的*Hin*dⅢ酶切）
1.5mol/L NaCl/0.5mol/L NaOH
0.5mol/L Tris·Cl/3mol/L NaCl，pH7.0
√3×和2×SSC
√预杂交液
探针DNA：50ng探针片段（表10.3.1）或者100ng带有质粒带菌体的探针片段
随机寡核苷酸引发剂标记试剂盒或等量反应物（附录3E）
20μCi/μl [α-^{32}P] dCTP（6000Ci/mmol）
√杂交液
√高盐洗液

√低盐洗液，65℃

跑胶缓冲液的循环泵

洁净的海绵

Whatman 3MM 过滤纸

UV 交联剂（如 UV Stratalinker；Stratagene）

平台摇床

42～45℃培养器

G-50 葡聚糖凝胶柱（如 NuClean spin column；IBI 或者附录 3E）

100～65℃水浴

盖封闭的 1.5ml 离心导管

有合适的紧的带盖的塑胶盒

表 10.3.1　检测基因探针重排的探针

基因	探针片段(外侧限制位点)	消化组织 DNA 的合适限制酶	种系检测片段大小
免疫球蛋白重链	J_H3.5kb（*Bgl* Ⅱ）	*Bam*H Ⅰ	17kb
		*Eco*R Ⅰ	16kb
		*Hin*dⅢ	9.5kb
免疫球蛋白轻链 κ	C_κ2.5kb(*Eco*R Ⅰ)	*Bam*H Ⅰ	12kb
	J_κ1.8kb(*Sac* Ⅰ)	*Bam*H Ⅰ	12kb
		Sac Ⅰ	1.8kb
免疫球蛋白轻链 λ	C_λ3kb	*Eco*R Ⅰ	Igλ 多态，大多数个体
	(*Bam*H Ⅰ-*Hin*dⅢ)		为 8.0kb、14kb 和 16kb
TCR-α	—[b]	—[b]	—[b]
TCR-β	J_β1 0.55kb(*Xba* Ⅰ)	*Bgl* Ⅱ	11kb
		*Hin*dⅢ	5kb
	J_β2 4.5kb(*Eco*R Ⅰ)	*Bgl* Ⅱ	多态片段平均频率为
			10kb 和 9.3kb
		*Hin*dⅢ	9kb
TCR-γ	J_γ2.2kb(*Hin*dⅢ)	*Bgl* Ⅱ	12.6kb 和 9.5kb
		*Bam*H Ⅰ	19kb 和 14kb
TCR-δ[a]	J_δ1 1.9kb	*Bgl* Ⅱ	4.9kb
	(*Bgl* Ⅱ-*Eco*R Ⅰ)	*Eco*R Ⅴ	9.8kb 和 2.8kb
	J_δ2 1.2kb	*Bgl* Ⅱ	5.3kb
	(*Eco*R Ⅰ-*Sac* Ⅰ)	*Eco*R Ⅴ	9.8kb
	J_δ3 2.3kb	*Bgl* Ⅱ	5.4kb
	(*Sac* Ⅰ-*Eco*R Ⅴ)		

a DNA 印迹分析只有在已知的缺少 TCR-β 或 TCR-δ 链基因克隆重排的 T 细胞赘生物或者 T 细胞赘生物稀少的表达 TCR-γδ 的情况下可实用。

b 过多的 J_α 片段被常规分析。

1. 在一次 40μl 的反应中用合适的限制性内切核酸酶（表 10.3.1）和缓冲液在适当的温度下消化 10μg DNA 样品。每一种酶都包括了控制反应的正常和重排的 DNA。
2. 倒置用 TAE 溶解的加入了 2μg/ml 溴化乙锭的 300ml 13cm×25cm 或 350ml 20cm×

25cm 0.8%（*m/V*）的琼脂糖胶，选用 1mm 厚的 8 孔梳子。

3. 加入 8μl 6×上样缓冲液（终浓度为 1×），点样。在一个孔中点上分子质量标记。用带有缓冲液循环泵的电泳仪 40V 电泳 20～24h，至大分子质量 DNA 迁移出孔超过 3cm。拍照，显示分子质量标记。将胶置于透射紫外灯上 1min 以切断 DNA。切下左下角便于以后的分析。
4. 将胶泡在 1.5mol/L NaCl/0.5mol/L NaOH 溶液中 30min，间隔晃动。用水冲洗胶。将胶泡在 0.5mol/L Tris · Cl/3mol/L NaCl 溶液中 30min，间隔晃动。用水冲洗胶。Southern 印记过夜将 DNA 转移到尼龙膜上（附录 3G），选用缓冲液浸湿过的干净的海绵半浸在缓冲液里，上面覆盖 Whatman3MM 滤纸，而不用纱布条固定。
5. 拆开转膜装置。用铅笔在尼龙膜底部做标记。如果膜的不同部分需要与不同探针杂交，可以用单面的刀片按照胶孔的指示将膜切开。用 2×SSC 浸膜。用紫外线交联仪将 DNA 与尼龙膜交联。将膜夹在 Whatman 3MM 滤纸中，用保鲜膜包好，室温保存。
6. 用 3×SSC 将膜浸湿，把膜放入一个可以热封口的袋子里。将袋子的三边热封好，每边封两次。加入 10ml 与杂交溶液。用塑料移液器头在袋口处来回搅动以排出气泡。封好第四边。将杂交带粘在平板摇床上放在温箱里。42～45℃预杂交 3～24h。
7. 用随机寡核苷酸引物标记试剂盒和 50μCi [α-^{32}P] dCTP 将探针 DNA 进行同位素标记，达到活性 2×10^8 cpm/μg。采用色谱法用 G-50 葡聚糖凝胶柱纯化探针，将其于未结合的核苷酸分离。将探针置于带有盖锁的试管中沸煮 10min，于冰上冷却，最高转速点离。
8. 剪开杂交带，去预杂交液。加入 10ml 杂交液和沸煮过的探针，加入探针的量按每 100cm^2 膜 10×10^6～40×10^6 cpm 来计算。去气泡封好杂交带，将其贴在平板摇床上 42℃孵育过夜（不少于 8h）。
9. 将膜从杂交袋中取出，放入干净的盖子可以扣紧的塑料盒里，加入 500ml 高盐溶液。室温摇 5min。将有放射性的杂交液和洗液妥善处理，再加入 500ml 新的高盐溶液。室温摇 5min。
10. 去净高盐溶液并取出膜。向盒中加入 65℃的低盐洗液再放入膜。注意不要将热的溶液直接倒在膜上。盖上盖子，在 65℃水浴里静置 20～30min。如果做的是多张膜印记，则须在 15min 后改变膜的叠放次序。
11. 倒掉洗液，再重复洗膜，直到用 Geiger 测量仪检测到膜的放射性接近背景值。如果放射性自显影背景过高则在更高的温度下（66～68℃）用低盐洗液再次洗膜 30min。用 Geiger 测量仪检测，必要时再重新洗膜。
12. 将印记好的膜在 3MM 滤纸上干燥后用保鲜膜包好放入有强化屏的可以扣紧的显影夹中紧靠着 X 线。－70℃曝光 3～4d（对于背景较高的膜则曝光 8～12h；对于肿瘤组织较少的可以延长曝光时间到 7d）。洗片。如果在杂交过程中存在问题，请参考表 10.3.2。

表 10.3.2 Southern 印记杂交问题解答

问题	可能的原因	解决方法
某个泳道的杂交信号弱	样本 DNA 部分降解	在 EB 染色的胶图上检查 DNA 的降解。重新制备 DNA 样本或增加上样量
	样品 DNA 消化不充分	在 EB 染色的胶图上检查 DNA 的不完全消化。用分光度法检测 DNA 纯度和浓度,如果不纯则重新抽提和沉淀 DNA;如果过浓,则稀释(适合的浓度为 1μg/μl)
整张膜信号弱	DNA 转移差	重新电泳,注意转膜过程的操作。用紫外线将 DNA 固定在膜上
	探针的活性低	刮膜,重新用新鲜制备的高活性探针杂交
背景高	非特异杂交	更高强度重新洗膜 刮膜,重新用新纯化的去除了未结合放射性核苷酸的探针杂交 重做实验,注意转膜过程中不要折膜或者刮伤膜

备选方案 1　PCR 检测克隆免疫球蛋白重链基因的重组

附加材料（基本方案 1；标√的条目参见附录 1）

1～2ml 骨髓或 5ml 全血
√PBS
√聚蔗糖泛影钠溶液
0.1μg/μl 正常及重排列对照 DNA（如 B 细胞系或克隆组织中的多克隆反应性淋巴 DNA 及肿瘤 DNA）。
√10×PCR 扩增缓冲液
√25mmol/L · $MgCl_2$
10mmol/L 4dNTP 混合溶液
√10μmol/L 免疫球蛋白重链寡核苷酸内侧和外侧引物（V_H 和 J_H）
5U/μl Taq DNA 聚合酶矿物油，如有必要
0.2U/μl *E. coli* DNA 聚合酶Ⅰ Klenow 大片段溶于 50mmol/L Tris-Cl（pH8.0）/10mmol/L $MgCl_2$（反应缓冲液 1；GIBCO/BRL）
15ml 离心管
离心机和能够产生 400*g* 离心力的转头
热循环仪（Perkin-Elmer Cetus 9600 或同类型仪器）和适合的试管

1. 将 1～2ml 骨髓或 5ml 全血置于 15ml 离心管中，加等体积的 PBS，混匀。小心地将聚蔗糖泛影钠溶液铺在样品/PBS 混合物（3ml 聚蔗糖泛影钠/6ml 混合物）或者是在聚蔗糖泛影钠顶部的层数样品混合物下。用离心机在室温下 400*g* 离心30～40min。
2. 去除上层的血浆和血小板，避免冲击单核细胞层。用一新移液管吸取并转移单核细胞层到 15ml 的离心管中。用 PBS 洗两次。
3. 使用标准方法（附录 3A）分离 gDNA。用无菌水重悬 DNA 至浓度为 0.1μg/μl 。
4. 按以下顺序配制主反应液（每反应 39.75μl）。根据反应计划将体系加倍（包括正常、重组和无 DNA 对照），考虑到加样误差还需在此基础上再增加一个体系。使用带筛

子的移液管以避免样品污染。

18.75μl 无菌水；

5μl 10×PCR 扩增缓冲液（终浓度为 1×）；

3μl 25mmol/L $MgCl_2$（终浓度 1.5mmol/L）；

8μl 10mmol/L 4dNTP 混合物（终浓度 1.6mmol/L）；

2.5μl 10μmol/L 免疫球蛋白重链 V_H 外侧引物（终浓度 0.5μmol/L）；

2.5μl 10μmol/L 免疫球蛋白重链 J_H 外侧引物（终浓度 0.5μmol/L）；

将主反应液轻柔涡旋混匀并置于紫外线交联器照射 10min。

5. 按照每个反应 0.25μl 5U/μl *Taq* DNA 聚合酶的量将其加入到主反应液中。轻柔涡旋混匀后将主反应液分装到各个反应管中，每管 40μl。向对照和样品反应管中加入用 10μl 无菌水溶解的 1μg 模板 DNA，向无 DNA 对照反应管中加入 10μl 无菌水。如有必要则在反应体系上覆盖 100μl 矿物油。
6. 将反应管置于热循环仪中，运行以下扩增程序。

初始步骤：	2min	95℃（变性）
29 个循环：	10s	95℃（变性）
	30s	40℃（退火）
	30s	70℃（引伸）
1 个循环：	10s	95℃（变性）
	30s	40℃（退火）
	7min	75℃（延伸）
最后步骤：	无穷	4℃（恒温）

循环参数根据 Perkin-Elmer Cetus 9600 热循环仪进行优化。

7. 取 5μl PCR 产物用 0.5×TBE 配制 2%（质量体积比）琼脂糖胶进行水平电泳检测（附录 3G）。用 0.5μg/ml 溴化乙锭染胶，在紫外透摄灯下观察是否有 100bp PCR 产物。
8. 按照第 4 和第 5 步所述配制第二轮 PCR 反应体系，将引物替换为 V_H 和 J_H 内侧引物。将 1μl 第一轮 PCR 产物用 9μl 无菌水稀释后加入到反应管中。如果第一轮反应用电泳检测到存在非特异性扩增或者有引物二聚体形成则需增加第一轮反应产物的用量。
9. 将反应管插入热循环仪中运行上述循环程序，将退火温度改为 58℃，检测反应产物，如有产物扩出则进行第 10 步。
10. 将 4μl 反应产物和 1μl 0.2U/μl Klenow 片段混合，于 37℃静置 1h，向反应体系中加入 1μl 6×上样缓冲液上样到 12%（质量体积比）非变性聚丙烯酰胺凝胶（单元 7.2 和 CPMB 单元 2.7），2800V× h 电泳（如 200V×14h）。

备选方案 2 PCR 和变性梯度凝胶电泳检测克隆 T 细胞受体-γ 基因重组

附加材料（基本方案 1；标√的条目参见附录 1）

√10×扩增缓冲液

√25mmol/L 氯化镁

√10mmol/L 4dNTP 混合物

10μmol/L $V_{\gamma 1}$、J_γ 内侧、外侧引物或 $V_{\gamma 9}$ 外侧引物和 J_γ 内侧、外侧寡核苷酸引物（图 10.3.1）

A

TCR $V_{\gamma 1-8}$ 和 J_γ 引物

$V_{\gamma 1}$ 外侧引物	5′ – GAAGCTTCTAGCTTTCCTGTCTC – 3′
$J_{\gamma 1}$ 外侧引物	5′ – CGTCGACAACAAGTGTTGTTCCAC – 3′
$V_{\gamma 1}$ 内侧引物	5′ – CTCGAGTGCGCTGCCTACAGAGAGG – 3′
$J_{\gamma 1}$ 内侧引物	5′ – GGATCCACTGCCAAAGAGTTTCTT – 3′

B

TCR $V_{\gamma 9}$ 和 J_γ 引物

$V_{\gamma 9}$ 外侧引物	5′ – GGAATTCCAAATTCTTGGTTTA – 3′
J_γ 外侧引物	使用 J_γ 外侧引物（如上）
$V_{\gamma 9}$ 内侧引物	使用 $V_{\gamma 9}$ 外侧引物
J_γ 内侧引物	使用 J_γ 内侧引物（如上）

图 10.3.1　检测 TCR-γ 基因重组的引物序列。A. TCR-γ、$V_{\gamma 1}$～$V_{\gamma 8}$、J_γ 外侧和内侧引物序列。B. $V_{\gamma 9}$、J_γ 外侧和内侧引物序列。如果使用 $V_{\gamma 1}$ 和 J_γ 引物检测后没有发现重组，则使用这几组引物再进行 PCR 检测。

5U/μl *Taq* DNA 聚合酶

0.1μg/μl 用聚蔗糖-泛影钠分离的单个核细胞中提取的模板 DNA

0.1μg/μl 正常和重组对照 DNA（如正常血细胞 DNA 和从细胞系或肿瘤中得到的 T 细胞克隆 DNA）

矿物油，如有必要

√3mol/L pH5.2 的乙酸钠

100%（体积比）乙醇

√DGGE 上样缓冲液，60℃

配有适合的反应管的热循环仪（Perkin-Elmer Cetus 9600 或相同功能的其他机型）

0.5ml 微型离心管

95℃和 65℃水浴

1. 按以下顺序配制主反应液（每反应 39.75μl）。根据反应计划将体系加倍（包括正常、重组和无 DNA 对照），考虑到加样误差还需在此基础上再增加一个体系。使用带筛子的移液管以避免样品污染。

21.25μl 无菌水；

5μl 10×PCR 扩增缓冲液（终浓度为1×）；

3μl 25mmol/L $MgCl_2$（终浓度1.5mmol/L）；

8μl 10mmol/L 4dNTP 混合物（终浓度1.6mmol/L）；

1.25μl 10μmol/L$LV_{\gamma1}$外侧引物（终浓度0.25μmol/L）；

1.25μl 10μmol/L J_γ外侧引物（终浓度0.25μmol/L）。

将主反应液轻柔涡旋混匀并置于紫外线交联器照射10min。

2. 按照每个反应0.25μl 5U/μl *Taq* DNA 聚合酶的量将其加入到主反应液中。轻柔涡旋混匀后将主反应液分装到反应管中，每管40μl。向样品反应管和正常、重组对照中加入10μl 0.1μg/μl 的模板 DNA，向无 DNA 对照反应管中加入10μl 无菌水。如有必要则在反应体系上覆盖100μl 矿物油。

起始步骤：	1min	95℃（变性）
29个循环：	15s	95℃（变性）
	30s	40℃（退火）
	30s	70℃（延伸）
1个循环：	7min	75℃（延伸）
最后步骤：	无穷	4℃（恒温）

循环参数根据 Perkin-Elmer Cetus 9600 热循环仪进行优化。

3. 取5μl PCR 产物，用1.2%（*m*/*V*）琼脂糖在0.5×TBE 缓冲液（附录3G）中进行水平凝胶电泳。用0.5μg/ml 溴化乙锭染色，在紫外线下成像，产物为500bp。

4. 准备第二轮 PCR，按下述成分配制总反应液（每反应管90μl）：

58.5μl 灭菌水；

10μl 10×PCR 扩增缓冲液（终浓度1×）；

16μl 10mmol/L 4dNTP 混合液（终浓度1.6mmol/L）；

2.5μl 10μmol/L inner $V_{\gamma1}$引物（终浓度0.25μmol/L）；

2.5μl 10μmol/L inner J_γ 引物（终浓度0.25μmol/L）；

0.5μl 5U/μl *Taq* DNA 聚合酶。

轻柔涡旋振荡，每反应管中加入90μl 总反应液。

5. 每反应管中加入10μl 第一轮 PCR 产物。把反应管放置在 PCR 仪上，并按第3步程序进行扩增，将循环数由25减少到15。用10μl 反应产物检测是否有500bp 扩增产物。

6. 把剩余的90μl 反应产物加入0.5ml 离心管中，加入10μl 3mol/L 乙酸钠和250μl 100%乙醇。−20℃孵育30min。4℃，最大转速离心30min。弃去乙醇，让 DNA 沉淀自然干燥，然后重悬于5μl 水中。95℃ 孵育5min，60℃孵育1h，以使 DNA 变性。

7. 制备浓度梯度为30%～60%的尿素/甲酰胺变性液（CPHG 单元7.5）。在样品中加入5μl 60℃预热的 DGGE 上样缓冲液，最高转速短暂离心，并立即上样至胶中。60℃，150V 电泳6h。如果此方法没有检测出 DGGE，用 V 引物重复整个过程再做一次。

基本方案 2　使用反转录 PCR 检测染色体易位

此流程描述了如何使用反转录 PCR（RT-PCR）检测 t（9；22）（q34；q11）易位，这是一个在慢性髓细胞白血病和某些急性淋巴细胞白血病中常见的变异。图 10.3.2 是此易位的图解，并给出了引物序列。

材料（标√的条目参见附录 1）

√DEPC 水
1μg 骨髓和血样中提取的 RNA 沉淀（支持方案）
√5×反转录缓冲液
√2.5mmol/L 4dNTP 混合液（DEPC 水配制）
√0.1mol/L DTT
RNA 酶抑制剂（推荐 RNasin，Promega）
10μmol/L 引物 1（图 10.3.2）
200U/μl 反转录酶（Superscript RNase H^-；GIBCO/BRL）
10μmol/L 第一轮 PCR 引物组（图 10.3.2）
√10×PCR 扩增缓冲液
√25mmol/L $MgCl_2$
5U/μl *Taq* DNA 聚合酶
矿物油（如果需要）
10μmol/L 第二轮 PCR 引物组（图 10.3.2）
37℃、70℃、90℃水浴器材
热循环仪（Perkin-Elmer Cetus 480 热循环仪或相似机型）以及适用 PCR 管

1. 在 PCR 管中装入 1μg 由骨髓或血液提取的 RNA，再加入 20μl DEPC 水。70℃孵育 10min。冰上冷却，高速短暂离心。冰上保存。
2. 按下列成分配制反转录总反应液（每管 38μl）：
   8μl 5×反转录缓冲液（终浓度 1×）；
   15μl DEPC 水；
   8μl 2.5mmol/L 4dNTP 混合液（终浓度 0.5mmol/L）；
   4μl 0.1mol/L DTT（终浓度 10mmol/L）；
   1μl 10μmol/L 引物 1（终浓度 0.25μmol/L）；
   1μl 200U/μl 反转录酶（终浓度 5U/μl）。
   加入 2μl RNA，混合。37℃孵育 1h，95℃加热 5min。室温短暂高速离心。冰上保存。
3. 要进行易位检测，需要制备两种总反应液（对照和融合测试；表 10.3.3）。同时制备无 RNA 对照以及对应阳性对照和阴性 RNA 对照的总反应液。在每管总反应液中加入 18μl 反转录酶，如有需要，盖上约 100μl 矿物油，放入热循环仪中，进行以下反应：
   起始步骤：　4min　94℃　（变性）

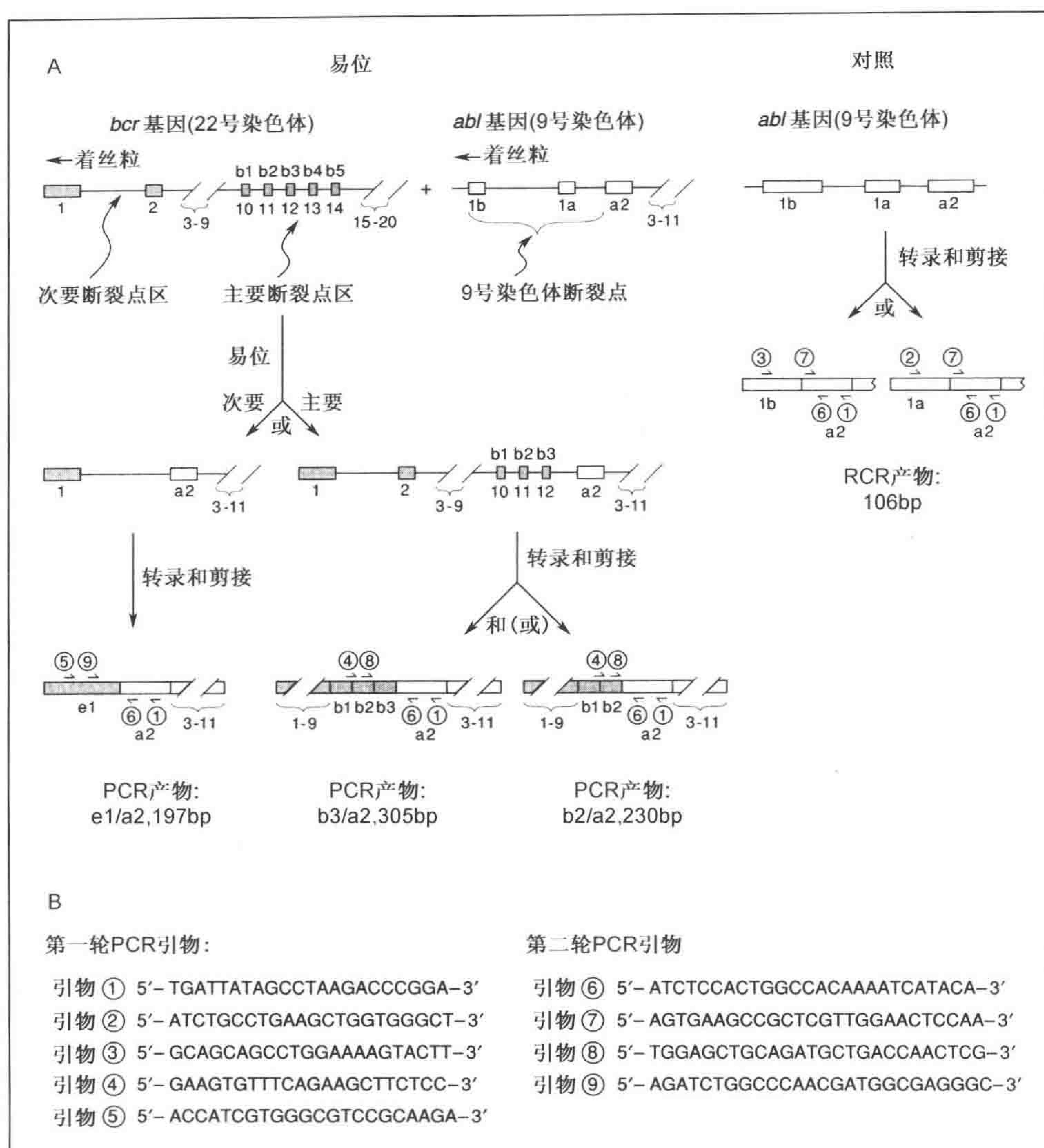


图 10.3.2　t（9；22）易位中重排的图解。A. 易位染色体和对照染色体的基因结构。22 号染色体上的 *bcr* 基因包含 20 个外显子。构成大断裂点的外显子 10～14，也分别被称为外显子 b1～b5。*Abl* 基因包含两个可选择的 1 号外显子，1b 和 1a。无论 9 号染色体断裂点是否是从 5′到这些外显子中的任意一个，这些外显子中尚无一个在融合 *bcl-abl* mRNA 中被检出。在几乎所有已报道的病例中，融合 mRNA 的 *abl* 基因都始于 2 号外显子（a2）的 5′端。3 个可能的 *bcr-abl* PCR 产物 e1/a2、b3/a2 和 b2/a2 在图下标出了产物大小。B. t（9；22）第 1 轮和第 2 轮 PCR 的引物。给出的碱基与人类 *abl* 序列相同（Shivelman *et al.*，1985）。第 1 轮 PCR 反义引物 1 与正义引物 2 和 3（对照）、4（大断裂点）或者 5（小断裂点）配对。第 2 轮 PCR 反义引物 6 与正义引物 7（对照）、8（大断裂点）或者 9（小断裂点）配对。本检测中，*abl* 基因作为对照。因 *abl* 基因可能有两个不同的 1 号外显子，所以需要两个引物 2 和 3。引物 4 和 8 与 *bcr* 基因的大断裂点区域杂交。引物 5 和 9 与 *bcr* 基因的 1 号外显子杂交，该外显子位于 *bcr* 基因小断裂点上游，1 号内含子内。

26 个循环：	1min	94℃	（变性）
	1.5min	61℃	（退火和延伸）
1 个循环：	10min	72℃	（延伸）
最终步骤：	无穷大	4℃	（恒温）

循环参数根据 Perkin-Elmer Centus 480 热循环仪进行优化。

表 10.3.3 t(9;22)和 t (14;18)易位检测第 1 轮 PCR 总反应液配制方法

成分	t(9;22)检测[a]		t(14;18)检测[b]		
	对照/μl	融合/μl	对照/μl	mbr 融合/μl	mcr 融合/μl
10μmol/L 引物 1	2	2	2	2	—
10μmol/L 引物 2	2	—	2	—	—
10μmol/L 引物 3	2	—	—	2	2
10μmol/L 引物 4	—	2	—	—	2
10μmol/L 引物 5	—	2	—	—	—
10×PCR 缓冲液	5	5	5	5	5
20mmol/L $MgCl_2$	3	3	3	4.5	4.5
水	17.75	17.75	13.75	12.25	12.25
5U/μl *Taq* 聚合酶	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
2.5mmol/L 4dNTP 混合液	—	—	4	4	4

a 见图 10.3.2 中 t(9;22)检测引物序列；

b 见图 10.3.3 中 t(14;18)检测引物序列。

4. 将 2μl 反应产物加入 198μl 水中。涡旋混匀，短暂离心。准备两种总反应液（对照和融合测试；表 10.3.4）。将 10μl 稀释的第一轮 PCR 反应产物加入到对应总反应液，按照第 3 步反应条件进行热循环，仅将循环数由 26 改为 30。
5. 每个第 2 轮 PCR 产物取 15μl，在含 0.5μg/ml EB（附录 3G）的 2.5%（*m/V*）琼脂糖上电泳检测。大片段易位会产生 305bp 和（或）230bp 的条带，小片段易位会产生 197bp 的条带。如果两者同时存在，大片段和小片段融合 mRNA 可能产生 262bp 的条带。对照组产生 106bp 的条带。

表 10.3.4 用于分析 t(9;22)和 t(14;18)的第二轮 PCR 的主反应体系

反应成分	t(9;22)分析[a]		t(14;18)分析[b]		
	对照/μl	Fusion/μl	对照/μl	mbr fusion/μl	mcr fusion/μl
10μmol/L primer 2	—	—	2	—	—
10μmol/L primer 5	—	—	2	2	—
10μmol/L primer 6	2	2	—	2	2
10μmol/L primer 7	2	—	—	—	2
10μmol/L primer 8	—	2	—	—	—
10μmol/L primer 9	—	2	—	—	—
10× PCR 缓冲液	5	5	5	5	5
2.5mmol/L $MgCl_2$	3	3	3	4.5	4.5
2.5mmol/L 4dNTP 混合溶液	4	4	4	4	4
水	23.75	21.75	23.75	22.25	22.25
5U/μl *Taq* 聚合酶	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25

a t(9;22) 引物序列见图 10.3.2；

b t(14;18) 引物序列见图 10.3.2。

支持方案1　胍盐法快速抽提RNA

材料

由1～2ml骨髓或5ml全血中分离的单核细胞（备选方案1，第1和2步）
√不含钙离子和镁离子的HBSS
√RNA分离溶液Ⅰ
2mol/L乙酸钠，pH4
√平衡酚
24∶1（*V*/*V*）氯仿/异戊醇
100%和70%（*V*/*V*）乙醇
√RNA分离溶液Ⅱ
√DEPC处理过的水

1. 用不含钙镁离子的HBSS洗单核细胞沉淀一次。用HBSS重悬细胞并分到3个1.5ml离心管中。100*g*离心2min。去上清。马上使用或保存在−70℃不超过4个月。一管用于抽提RNA，其余两管用于重复分析。
2. 向细胞沉淀加入0.5ml RNA分离溶液Ⅰ。反复吸打使细胞破裂。加入0.05ml 2mol/L乙酸钠。涡旋，最大转速点离。加入0.5ml平衡酚。涡旋，离心。加入0.1ml 24∶1氯仿/异戊醇。涡旋，4℃最大转速离心15min。
3. 将0.4ml上层的水相转移到新的预先加入了0.8ml 100%乙醇的1.5ml离心管中，小心在吸出水相时不要破坏分层界面。于−20℃静置长于1h。4℃最大转速离心15min。去上清。
4. 向沉淀加入300μl RNA分离溶液Ⅱ，涡旋使沉淀重悬。最大转速点离。加入600μl 100%乙醇，混匀。−20℃静置长于1h。4℃高速离心15min。去上清。用0.5ml 70%乙醇洗沉淀。去除乙醇。如果沉淀从管底飘起则先4℃高速离心5min再去除乙醇。
5. 用石蜡膜盖住开口的离心管，用针在上面戳几个孔。短暂真空干燥沉淀或令沉淀自然干燥。在−70℃或更低的温度下保存干燥的RNA，如果可以马上进行分析则将RNA溶于20μl DEPC处理过的水中。

备选方案3　用PCR在DNA样品中检测染色体易位

在90%滤泡淋巴瘤和30%大细胞淋巴瘤中存在t（14；18）（q32.3q21.3）易位，造成的位于18号染色体的*bcl*-2基因上的断裂位点集中在一个或两个DNA区域（图10.3.3）。

附加材料（基本方案2）

0.1μg/μl从骨髓或外周血中提取的样本DNA或对照DNA（备选方案1，第1～3步）
10μmol/L t（14；18）（q32.3q21.3）引物（图10.3.3）
内部寡核苷酸探针序列（可选）

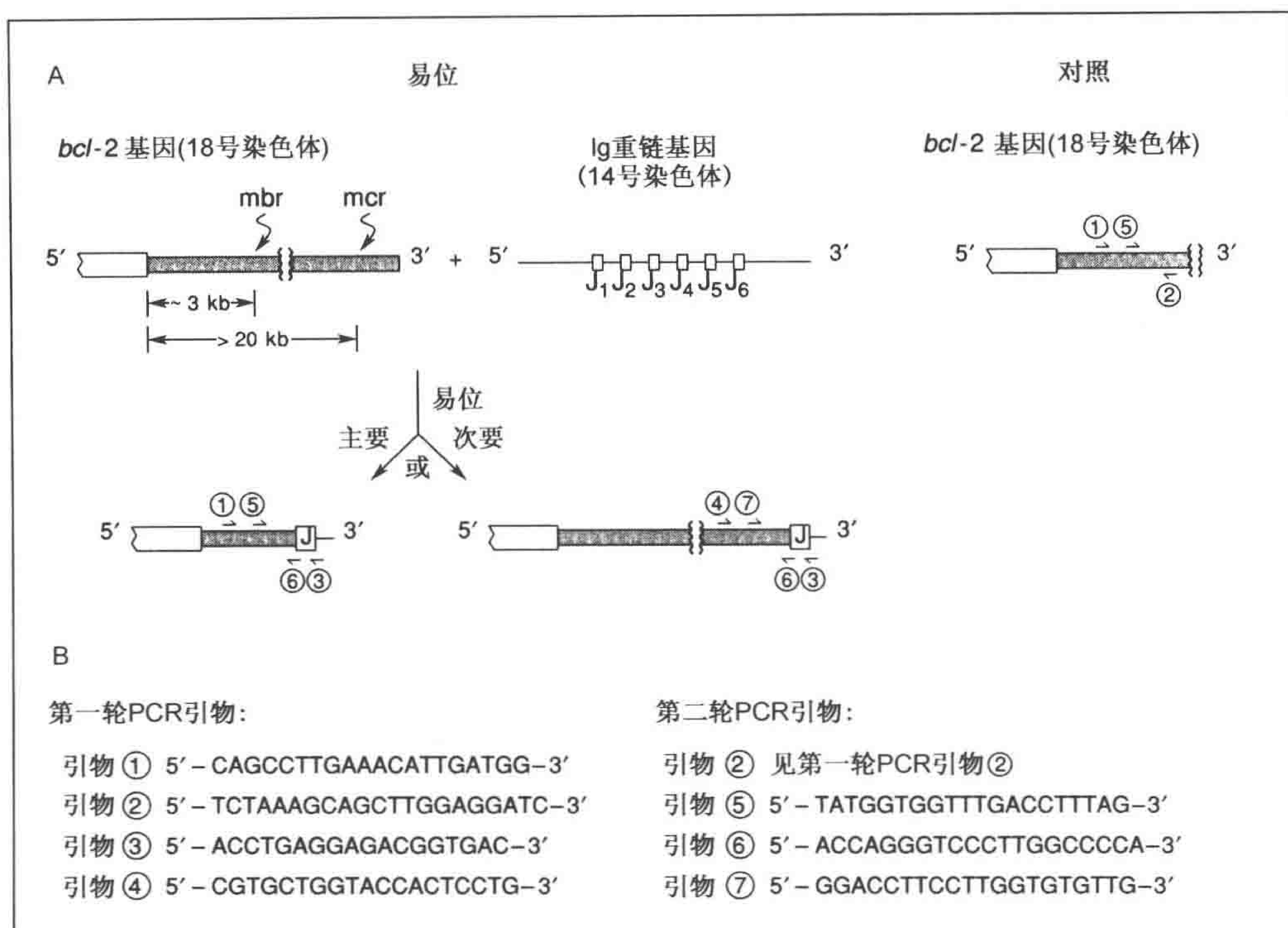


图 10.3.3　异位 t（14；18）的重组示意图。A. 异位染色体和对照染色体的基因结构。*bcl*-2 基因在主要断裂区（mbr）或次要断裂区（mcr）断裂与免疫球蛋白重链基因 D（未显示）或 J 区融合。*bcl*-2 基因还被用作对照以说明提取的 DNA 可以用于扩增。图中标出了各引物的相应位置。B. 用于检测 t（14；18）的第一轮和第二轮 PCR 反应引物序列。第一轮 PCR 反应正向引物（主要断裂点）与反向引物 2（对照）或 3（J_H）配对使用；反向引物 3 也可以与正向引物 4（次要断裂点，配对使用。第二轮 PCR 反应正向引物 5（主要断裂点）与反向引物 2（对照）或 6（J_H）配对使用；反向引物 6 也可与正向引物 7（次要断裂点）配对使用。

mbr：5′-GCCTGTTTCAACACAGACCC-3′
mcr：5′-GGACCTTCCTTGGTGTGTTG-3′

1. 对于每一个标本，按照表 10.3.3 配制对照和主要断裂点（mbr）主反应混合液。向对应管中加入 20μl 0.1μg/μl 的样本与对照 DNA。如果有必要则在上面覆盖 100μl 石蜡油，放入热循环仪。运行以下程序

起始步骤：	4min	94℃(变性)
30 个循环：	1min	94℃(变性)
	1min	55℃(退火)
	1min	72℃(延伸)
1 个循环：	8min	72℃(延伸)
最终步骤：	无穷大	4℃(恒温)

循环参数根据 Perkin-Elmer Cetus 480 热循环仪进行优化。

2. 向 198μl 水中加入 2μl 上述反应体系。混匀，点离。按表 10.3.4 配制主反应体系。用第二轮槽式 PCR 引物。加入 10μl 稀释的第一轮反应产物，运行第一步扩增程序。
3. 每个第二次反应产物取 15μl 用含 0.5μg/ml 溴化乙锭的 2.5%（m/V）琼脂糖胶进行电泳分析（附录 3G）。主要易位断点将产生 100～300bp 的片段。对照则产生 386bp 的片段。
4. 如果上述方法没有检测出易位，重复第 1～3 步，采用特异性扩增微断裂点融合的主反应体系（表 10.3.4）和引物（图 10.3.3），将退火温度改为 58℃。不要重复对照（考虑到 DNA 的完整性）。主要易位断点将产生 200～1200bp 的片段。
5. 如果对于某条带是否代表易位有疑问，则可选择合适的内部寡核苷酸探针序列用 Southern 印记杂交进行验证（附录 3G）。

参考文献：Negrin and Blume，1991；Sklar，1992

编者：Janina Longtine，Edward Fox，Carol Reynolds，and Jeffrey Sklar

单元 10.4　肿瘤中基因扩增的分子分析

注意：任何样品中低水平扩增的定量和分析都应该设置重复，以确保没有假阳性。

基本方案　Southern blot 杂交法检测基因扩增

Southern blot 杂交分析的故障排除指南见表 10.4.1

表 10.4.1　Southernblot 杂交分析故障排除指南

问题	可能原因	解决方法
DNA 制备		
没有 DNA 沉淀	DNA 浓度太低	－20℃孵育 2h 以上
DNA 不溶解	蛋白质污染	匀浆新的肿瘤组织
	TE 缓冲液体积太小	增加 TE 缓冲液
DNA 浓度太低	坏死的或纤维变性的肿瘤组织	匀浆更多的肿瘤组织
DNA 浓度波动	样品浓度太高	稀释到 50～300μg/ml
	样品不均匀	振荡器充分混匀
	移液器不准	移液器校准
酶切后无 DNA 沉淀	离心不够	最大转速，4℃离心 15min
电泳		
DNA 漂浮，不扩散	DNA 没有酶切消化	重新酶切
DNA 扩散不均匀	盐浓度过高	重新酶切
DNA 逸散出加样孔	乙醇残留	重新酶切
DNA 样品降解	坏死肿瘤组织	匀浆新的肿瘤组织
	试剂污染	换新试剂
酶切不完全	蛋白质、盐或 OTC 污染	用链霉蛋白酶重新消化，重新沉淀和充分洗涤
	酶浓度太低或活性不够	使用新酶
上样过低或过高	DNA 定量不准	重新定量

续表

问题	可能原因	解决方法
DNA电泳不均一	盐浓度错误	配制新鲜的10×TBE,充分混匀
	琼脂糖凝胶不均匀	制备新胶
	电压过高或不均匀	检查电极和电压装置
转移		
硝酸纤维素膜预湿不均匀或电转太慢	膜太陈旧或被污染	更换新膜
硝酸纤维素膜烘烤后易碎	胶不完全中和烘烤过度	检查中和溶液的pH
		检查电炉温度和功能
杂交和放射自显影分析		
背景太高	探针中包含重复DNA	使用新的探针或封闭DNA
	探针被降解	用胶检测探针
	杂交溶液在滤纸上被干燥	用低盐、高温溶液洗涤
低信号	探针浓度太低或大小不够有效	重新标记或使用新的探针
	过度洗涤	反复转移和低强度洗涤
	DNA转移不够	转移后染胶检测转移效果
	DNA被降解或没有被酶切	胶上检测DNA大小和酶切情况;制备新的DNA
异常条带	DNA酶切不完全	更多的酶重新酶切
	DNA被其他(如质粒)污染	匀浆新的肿瘤组织
	多态/重组	用其他的酶
斑点和污点	膜被污染	换新膜
	手套滑石粉	戴手套后充分洗涤
	杂交溶液不均衡	混合均匀,室温预热1h以上
	探针混合不均匀	杂交融合混合充分
	杂交溶液中有气泡	杂交中避免气泡

材料（标√的条目参见附录1）

肿瘤组织（支持方案）

DNA 提取试剂盒（Strategene）或等效物

√DNA 提取试剂：50mmol/L Tris·Cl（pH8.0）/20mmol/L EDTA（pH8.0）/2%（*m*/*V*）SDS（参见单独的配方）

225mg/ml pronase

NaCl 提取液：饱和的 NaCl 溶液

10mg/ml 的 RNase

100%和 70%的乙醇，冰冻

√TE 缓冲液，pH8.0

√小牛胸腺 DNA 标准品：10μg/ml、100μg/ml、250μg/ml 和 500μg/ml

√毛细试验溶液，使用前配制

√1×TNE 缓冲液

单拷贝对照用 DNA

扩增对照用 DNA

√1mol/L 亚精胺

10U/μl 限制酶和相关的10×缓冲液

1mg/ml 牛血清白蛋白

4mol/L NaCl

√6×上样缓冲液

0.25mol/L HCl，只用于感兴趣的>10kb的条带

变性液：0.5mol/L NaOH/1mol/L NaCl，新鲜配制并平衡30min

复性液，新鲜配制

√20×和60×SSC

Quik-Hyb 溶液（Strategene）

√10mg/ml 鲱精子DNA，声处理并煮沸

双链DNA探针，该探针以随机引物法标记上［α-^{32}P］dCTP，比活度不低于1×10^9cpm/μg DNA，并经spin柱纯化（附录3E）

√20% SDS

7.5ml 圆形玻璃匀浆器或等效物

30ml 和 50ml 离心管

能调到37℃和65℃的水浴装置，并带有摇床

Sorvall 离心机和JS-5.2转子（或等效物）

大容积 pipet

真空泵装置（产生≥30mmHg的气压）或Speedvac蒸发器

2ml 或 5ml O边的螺旋盖管

Rocker 台（架）

mini 荧光计和10μl毛细管（Hoefer）

0.5ml 和 1.5ml 微离心管

10μl 毛细管（Hoefer）

Nitrocellulose 膜

钝头镊子

80℃真空烘箱或UV cross-linker

热封聚乙烯袋子

沸水浴床

X-AR 放射自显影片子

1. 用手术刀把一小片或多小片肿瘤组织切成小粒。往7.5ml圆形玻璃匀浆器加入几微升DNA提取液然后把组织匀浆。对于血红细胞或骨髓样本，先把样本放在－80℃冻1～2h，然后进行匀浆。液体样本<3ml直接进行匀浆。
2. 把匀浆转移到一30ml离心管，加DNA提取液至总体积为14ml。加入62.5μl pronase（终浓度为1mg/ml）。37℃孵育过夜。偶尔倒转离心管使溶液混匀。
3. 冰上冷却离心管≥10min。加入5ml NaCl提取液并颠倒几次。4℃ 2000g离心20min。用以大容积的pipet把上清液转移到一50ml离心管。不要转移任何沉淀。
4. 加RNase至终浓度为20μg/ml。轻轻地振荡离心管，37℃，孵育≥15min。冰上冷却

离心管≥10min。加入2.5倍体积的冰冷的100%的乙醇并颠倒几次。看到DNA沉淀出现。为了提高DNA的回收效率，−20℃孵育≥20min。

5. 4℃ 2000*g* 离心20min。小心地倒掉乙醇。加入约25ml 70%的乙醇到DNA沉淀，轻轻地振荡。离心10min。小心地倒掉70%乙醇。室温下在30mmHg真空泵或Speedvac蒸发器中使样品干燥15min。
6. 加入200～2000μl TE缓冲液（根据DNA沉淀的大小）到离心管以获得浓度为50～100μg/ml的DNA溶液（假设100mg样本生成100μg DNA）。把DNA转移到2ml或5ml O形边的螺旋盖管并在转鼓仪上混合15～30min（或过夜）使沉淀溶解。如果过夜混合后沉淀没溶解就加入更多的TE缓冲液。4℃永久保存DNA溶液，避免荧光照射。
7. 室温下把DNA样品和小牛胸腺DNA标准品在转鼓仪上孵育约15min。孵育的过程中，打开mini荧光计的电源，预热≥15min。
8. 往适当标记的0.5ml微离心管（双份准备）加入5μl新鲜配制的毛细试验溶液和2μl 1×TNE缓冲液。然后加入3μl DNA样本或小牛胸腺DNA标准品到样本管或标准品管，另外加3μl 1×TNE缓冲液到空白的毛细试验管，离心，混匀后再离心。
9. 把各自试验溶液从离心管转移到10μl毛细管。用空白管对荧光计进行校正并调零，接着用100μg/ml的小牛胸腺DNA标准品把仪器校准到100。然后测定其他标准品和DNA样品的浓度（理想浓度为50μg/ml和200μg/ml）。对≥300μg/ml的样品，用TE缓冲液稀释并重新测定。

   差异DNA展示（备选方案2）应该用来分析DNA浓度≤1μg/ml或DNA总浓度≤5μg/ml的样品。

10. 在1.5ml离心管里准备下列的样本和对照水解液：
    5μg DNA（样品，单拷贝对照或扩增的对照）；
    1.2μl 1mol/L亚精胺（终浓度为4mmol/L）；
    203μl无菌水。
11. 完全解冻并重悬10×限制酶缓冲液和1mg/ml的BSA。如果缓冲液有沉淀，65℃短时孵育。加30μl 10×缓冲液和30μl BSA到每一个样品管和对照管。以最大的速度短时离心。振荡并重新短时离心。让DNA在缓冲液混合液中平衡几分钟。每管中加入10μl 10U/μl限制酶。短时离心。轻轻地振荡并根据操作手册的建议进行孵育。
12. 短时离心。每管加入30μl（1/10体积）4mol/L NaCl和825μl（2.5倍体积）冰冻的100%乙醇。颠倒离心管几次并以中度振荡。−20℃孵育约30min。
13. 4℃，以最大速度离心15min。弃去上清。加入约1ml 70%乙醇。离心5min。小心地倒掉70%乙醇排干离心管中的液体。室温下在30mmHg真空泵或Speedvac蒸发器中使DNA沉淀干燥≥10min。加入10×TE缓冲液和2μl 6×胶上样染料。室温下孵育几分钟。
14. 准备倒0.6%～2.0%（*m*/*V*）溶解在1×TBE缓冲液（附录3G）中的琼脂糖胶（分离感兴趣的DNA片段）。上样。把单拷贝和扩增的对照分别点在胶的第一和最后一泳道。用适当的电压和适当的时间电泳从而使感兴趣的条带能清楚地分开。

15. 在 0.5μg/ml 的溴化乙锭溶液中染胶≤10min，染胶过程中中度摇动。用 UV 透射照明器对胶进行拍照。如果 DNA 没被破坏，试剂齐全，可接着进行转移。如果 DNA 有降解，进行差异 PCR（备选方案 2）对 DNA 进行分析。
16. 为了有效地转移＞10kb 的条带，把胶 depurinate 到 0.25mol/L 的 HCl 中 15～30min。对于所有感兴趣的条带，把胶泡在变性试剂中 30min，并中度摇动。不要让胶的表层干燥。把胶泡在复性液中复性 30min，并中度摇动。
17. 通过 Southern 印记技术在 6×SSC 中把 DNA 转移到 nitrocellulose 膜上，转膜时间为 4h 至过夜（附录 3G）。用钝头的镊子夹膜。为了对转移后的 DNA 进行固定，根据操作手册把膜放在 80℃真空烘箱或 UV cross-linker 中烤 2h。

    带电荷或不带电荷的尼龙膜只要在试验程序上进行适当的改变就可以使用。
18. 准备好含 1mg/ml 鲱精子 DNA 的平衡的 Quik-Hyb 溶液。在固定后的膜与杂交液一起装进热封聚乙烯袋子，并加入约 140μl Quik-Hyb 溶液/cm^2 膜。用热封接器封住袋子。65℃，有摇床的水浴箱中预杂交≥15min。
19. 对双链［α-^{32}P］dCTP-标记的探针煮沸约 10min（约 1×10^6dpm 探针/ml Quik-Hyb）。打开封闭的袋子，加入煮沸的探针。重新封闭袋子让探针在溶液中充分混匀。65℃，有摇床的水浴箱中预杂交 1～2h。
20. 准备三种洗脱液：用 2% SDS 稀释的 2×、0.5×和 0.2×SSC，并加热到 55℃。从袋子中取出膜，并依次用以上三种洗脱液洗，55℃每次 2～5min。膜上没有 DNA 的地方不能检测到计数，有的话也很少。对于有 150 个拷贝的扩增基因的对照，用 Geiger counter（如 mini-monitor，PRI）至少记录 100 计数/s。单拷贝的对照可记录 20 计数/s。
21. 把膜暴露给放射自显影 X-AR 膜一段时间，时间的长短根据对照信号的强弱决定（通常是过夜或 12～14h）。用密度计对膜进行分析。

备选方案 1　缝隙杂交技术检测基因扩增

这项技术的优点是只要 1～2μg 没降解的 DNA，而且曝光时间只要几小时。然而这方法在检测低水平的扩增时没有 southern 杂交的敏感，对扩增的真实水平可能会被低估。

附加材料（基本方案）

3.0mol/L NaOH，抽滤灭菌
2.0mol/L 乙酸铵，pH7.0，抽滤灭菌
斑点或缝隙杂交 manifold（如 Bio-Dot SF、Bio-Rad or Minifold2，Schleicher & Schuell）
nitrocellulose 或尼龙膜
Whatman 3MM 滤纸
加热灯

1. 用描述的方法（基本方案，第 1～9 步）准备肿瘤组织的 DNA。
2. 用单拷贝 DNA 对照作为稀释液 2 倍稀释扩增的 DNA 对照。不要用 TE 缓冲液稀释

扩增的 DNA。调解 DNA 浓度，从而在缝隙杂交使用的标准品，样品 DNA 的体积是一样的。

3. 让肿瘤 DNA 样品、对照和标准样品在转鼓仪上混合 10min。在 1.5ml 离心管中加 2μg DNA 到 TE 缓冲液中至终体积为 200μl。设计不含 DNA 的空白对照（只含 TE 缓冲液）。
4. 每个离心管加入 400μl TE 缓冲液和 60μl 3.0mol/L NaOH。振动离心管并短时离心。65℃孵育 1h。离心，冷却到室温（15min）。每管加入 660μl 2.0mol/L 的乙酸铵。振动离心管并短时离心。
5. 按照操作手册的说明组装斑点或缝隙杂交 manifold。每个缝隙杂交上 660μl 样品 DNA。对单拷贝和低水平检测，用欲湿的 nitrocellulose 膜能获得清晰的信号。对多探针 ，用尼龙膜。
6. 真空处理约 1min。拆散装备并用钝头的镊子把膜从上层板上揭下。含 DNA 一面向上，把膜放在一张干净的 Whatman 3MM 滤纸上。用加热灯干燥 5min。
7. 把膜放在 80℃真空烘箱中烤 2h。按照描述（基本方案，第 18～21 步）进行以下步骤：预杂交、杂交、洗，把膜暴露给放射自显影 X-AR 膜（约 3h），分析膜。

备选方案 2　差异 PCR 检测基因扩增

对于这个操作程序，必须取来自同一染色体的远距离的 DNA 片段（如其他的染色体臂）。由于染色体数目之间的差异，取来自另外的染色体上的基因作对照会产生假阳性和假阴性结果。对于检测低水平的基因扩增，这种方法不如 Southern 印记杂交敏感。

注意：做 PCR 需要特别的预防措施以防止污染。熟悉标准方法非常重要。

附加材料（基本方案；标√的条目参见附录 1）

√10×*Taq* DNA 聚合酶缓冲液：500mmol/L KCl/100mmol/L Tris · Cl，pH8.3（−20℃，保存时间≤18 个月；参见各自配方）

√25mmol/L $MgCl_2$

√1.25mmol/L 4dNTP 混合物

20μmol/L 目的和对照寡聚核苷酸引物，包括＋链和－链序列

5U/μl *Taq* DNA 聚合酶

矿物油（如果热循环仪有加热盖子的话不需要）

低分子质量 DNA marker（如 BioMarker Low；Bioventures）

0.5ml 微离心管

热循环仪

1. 按照前面的描叙（基本方案，第 1～9 步）准备肿瘤组织的 DNA。
2. 按照下面列出的顺序依次加入以下成分到 0.5ml 微离心管中配制 PCR 反应物：

10μl 10×*Taq* DNA 聚合酶缓冲液；

6μl 25mmol/L $MgCl_2$；

16μl 1.25mmol/L 4dNTP 混合物，新鲜稀释（200μl）；

5μl 20μmol/L 目的寡聚核苷酸引物，＋链序列（1.0μmol/L）；
5μl 20μmol/L 目的寡聚核苷酸引物，－链序列（1.0μmol/L）；
1μl 20μmol/L 对照寡聚核苷酸引物，＋链序列（0.2μmol/L）；
1μl 20μmol/L 对照寡聚核苷酸引物，－链序列（0.2μmol/L）；
0.5μl 5U/μl *Taq* DNA 聚合酶（2.5U）。
把离心管放在冰上。

使用的引物和模板的不同，引物和 Mg^{2+} 的最佳浓度不同。

3. 准备水空白（没 DNA）：加 44.5μl 反应混和物到装有 55.5μl 无菌水的 0.5ml 微离心管。轻轻混匀。覆盖 100μl 矿物油。把离心管放在冰上。
4. 煮沸 10～100μg 肿瘤 DNA 3min 加入到含无菌水的 0.5ml 微离心管至终体积为 55.5μl。加入 45.5μl 反应混合物。
5. 确定最佳的变性、退火、延伸的时间和温度。在这些条件下在热循环仪上进行 PCR 反应。把 PCR 产物保存在 4℃直至被用于分析。

通常的起始条件是：93℃变性 1.5min、60℃退火 1min、72℃延伸 1min。

6. 对于≤1kb 的产物，准备 2%（*m/V*）的琼脂糖胶，用 1×TBE 缓冲液溶解（对于较大的产物用较低浓度的胶；附录 3G）。取 3μl 扩增产物和对照于上样缓冲液混合后加到胶孔中，包括空白对照和低分子质量 DNA 分子质量标准。80V 电泳约 1h（直到溴酚蓝到达胶的末端）。用 0.5μg/ml 的溴化乙锭染胶，然后用蒸馏水冲洗，用 UV transilluminator 拍照。内对照条带的密度按一定的比例向对于目的基因的扩增水平会按一定的比例减少。

支持方案　肿瘤组织的获取及处理

材料

肿瘤组织
液氮或干冰
Cryotubes

1. 如果可能，直接从手术室获取肿瘤组织。处理前除去 staples 和 suture。如果样本已经包被在 mounting medium 用于做冷冻切片（如 OTC），处理前应尽可能多地除去 mounting medium。

对于固态的肿瘤组织

2a. 选择肿瘤上有代表性的样本（分红或红色区域），避免肿瘤的被膜（硬的，白色区域），fibrosis 或坏死（褐色或黑色区域）。对于转移的肿瘤组织，只要是实质部分形成的肿瘤就可以被使用。把样本切成约 $5cm^3$ 的小片有助于后面的保存和处理。如果可能，也要获取和保存作分子水平分析区域周围的组织切片用于做对照比较。
3a. 尽可能快地冷冻组织碎片，最后是把组织碎片直接加到液氮中。转移冷冻管并储存在－80℃。如果没有液氮，快速把样本装进干冰上的塑料管或容器中。－80℃或低于－80℃保存直至使用。
4a. 如果肿瘤样本要在别的研究所使用，把样本装进做好标记并封好的塑料管或容器

中，放在干冰中连夜运送。

对于液体肿瘤样本

2b. 确保样本含有一定量的肿瘤组织（>10%）对于检测 50～100 倍的扩增是必需的）。像上面描述的快速冷冻小体积的样本（<3ml）。如果样本>3ml，进一步处理浓缩细胞成分。

3b. 连夜运送干冰上的小体积的样本，如前所述。室温下连夜运送大体积液体样本。后者在用于提取 DNA 之前可在－20℃保存≤2d。

参考文献：Kellems，1993；look *et al.*，1991

编者：Jonathon C. Wasson and Garrett M. Brodeur

单元 10.5　甲基化特异性 PCR

注意：PCR 需要特别的预防措施以避免污染。对标准方法的熟悉是必需的。

基本方案 1　甲基化特异性 PCR 确定 DNA 甲基化的模式

甲基化特异性 PCR（MSP）是一种特异的、敏感的，而且经济的确定 CpG 岛甲基化模式的方法（图 10.5.1）。一般情况下，PCR 引物的 3′端包含有 1～3 个 CpG 岛，引物的长度要确保引物有近乎相同的融化温度和退火温度。

材料（标√的条目参见附录 1）

样本 DNA
阳性对照，已经确定有甲基化
阴性对照，已经确定无甲基化
√2mol/L 和 3mol/L NaOH
10mmol/L 对苯二酚，新鲜配置
3mol/L 重亚硫酸钠（pH5.0；用 5mol/L NaOH 调节），新鲜配置
矿物油
DNA Wizard cleanup kit（Promega）或等同物
80%（*V/V*）异丙醇
水（蒸馏或声处理），60～70℃
10mg/ml 糖苷配糖基
√10mol/L 乙酸胺
100%和 70%的乙醇，冰冻
√含有 1.5mmol/L 的 10×PCR 扩增缓冲液
√25mmol/L 4dNTP 混合物
300ng/μl 感兴趣的甲基化和非甲基化基因的正义和反义引物
Taq DNA 聚合酶
能调到 50℃的水浴设备

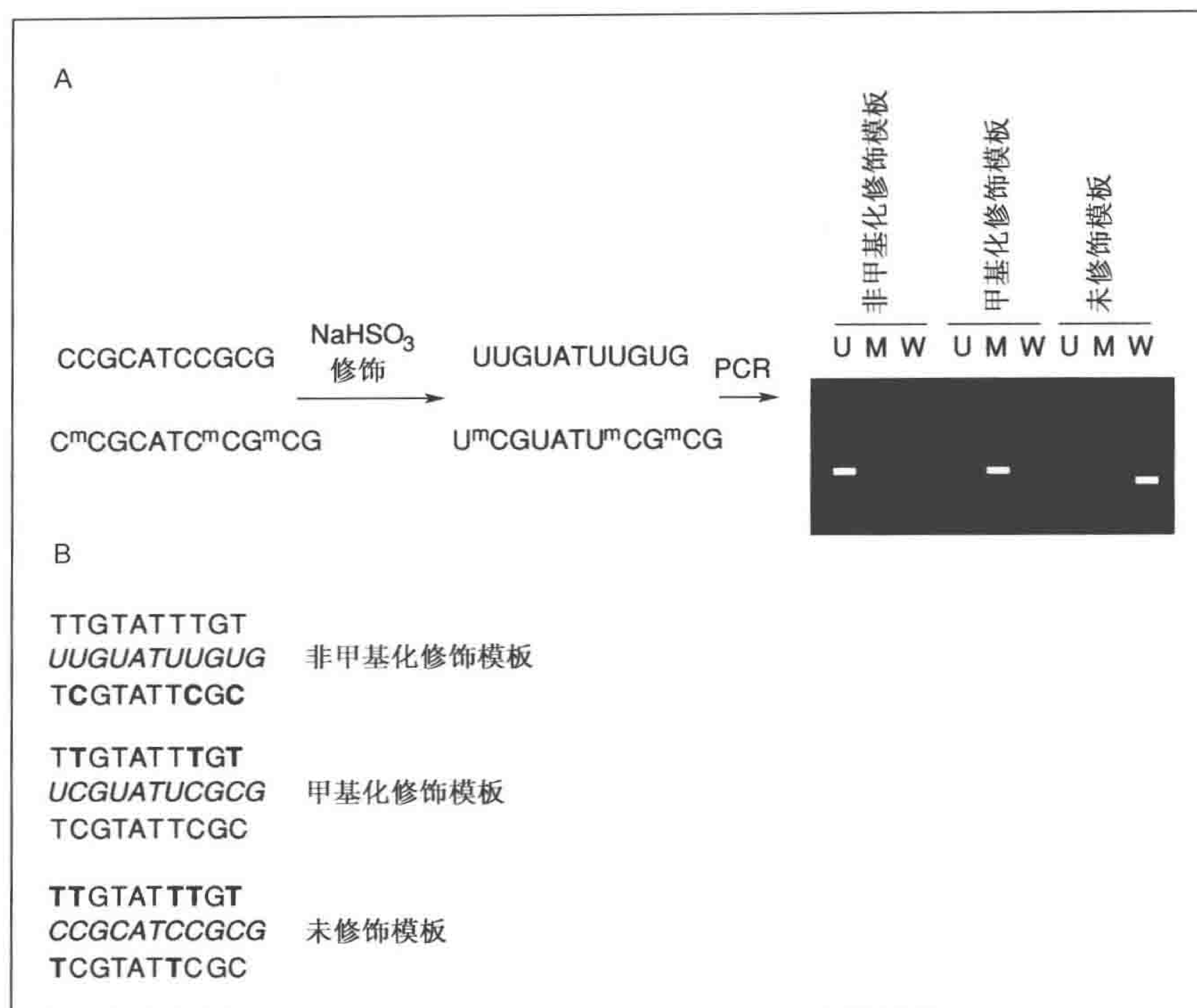


图 10.5.1　甲基化特异性 PCR（MSP）。A. 基因的单链位点，甲基化的胞嘧啶用^{m}C 表示。用重亚硫酸钠处理单链 DNA，非甲基化的胞嘧啶变成尿嘧啶，而甲基化的胞嘧啶保持不变。改变后的 DNA 用针对新生成的序列的特异性引物进行扩增，凝胶电泳对产物进行分析。B. 重亚硫酸盐改变后的模板序列。在每种情况中，上面的序列是非甲基化的特异性引物，中间（斜体字）是模板序列，下面的是甲基化特异性引物，错配的碱基用粗体表示。特异性针对非甲基化，改变了序列的引物只与这序列配对；由于有很多错配碱基所以避免与另一序列会别的模板退火及沿伸。针对甲基化，改变的序列的特异性引物也与没改变的（W，野生型）的模板或非甲基化的（U）的改变了的模板有错配。

Vacuum manifold

带控制管温度显示和适合管的热循环仪

1. 把样品 DNA（达 1μg）稀释到 1.5ml 微离心管中的 50μl 水中。如果使用的 DNA 更少（包括从石蜡包被的样品提取的 DAN），预期的产量少（如很微弱的条带）或者增加循环次数提高产量。准备好阳性和阴性对照 DNA 的稀释液和样品平行进行以下步骤。
2. 加入 5.5μl 2mol/L NaOH。37℃，孵育 10min。加入 30μl 新鲜配置的 10mmol/L 对苯二酚和 520μl 新鲜配置的 3mol/L 重亚硫酸钠。混匀并加入足量的矿物油（约 50μl）用以覆盖水相。50℃孵育 16h。
3. 除去油。加入 1ml DNA Wizard 试剂，把混合物加到试剂盒带有的 miniprep 柱。真空处理。用 2ml 80%异丙醇洗。把柱子置于一个干净的 1.5ml 管，加入 50μl 60～70℃的水。离心管子和柱子 1min。每管加入 55μl 3mol/L NaOH，室温孵育 5min。

4. 加入 1μl 10mg/ml 糖苷配糖基，然后加入 17μl 10mol/L 乙酸胺和 3 体积 100%的冰冻乙醇。-20℃，沉淀 DNA 几小时或过夜，离心 20min，去上清，用冰冻的 70%的乙醇清洗，加入 20～30μl 水溶解。处理单链 DNA 要像处理 RNA 一样（冷冻，尽量减小反复冻融，可能的话保存在-70℃）。
5. 进行甲基化和非甲基化反映所要分析的样品的数目，包括阳性和非 DNA 对照。准备好甲基化和非甲基化 PCR 反应（50μl）的主要反应混合物，包括：

   5μl 10×PCR 扩增缓冲液；

   2.5μl 25mmol/L 4dNTP 混合物；

   1μl 300ng/μl 的有义引物；

   1μl 300ng/μl 的反义引物；

   28.5μl 水。

   混匀。
6. 取 3.8μl 主要反应混合物到标记的 PCR 管。每管加入 2μl 重亚硫酸钠修改的 DNA 模板（第 4 步）。如果需要，每管加入 25～50μl 的矿物油，放入热循环仪。PCR 从 95℃变性 5min 开始。
7. 对每个样品，取 1.25U *Taq* DNA 聚合酶稀释到 10μl 无菌蒸馏水中。通过油层加入到 40μl 混合物中，并轻轻地吹打。也可以选择用其他形式热启动 PCR。按如下所示继续 PCR 扩增。

35 个循环：	30s	95℃	（变性）
	30s	不同的引物温度不一样	（退火）
	30s	72℃	（延伸）
最终步骤：	4min	72℃	（延伸）

   4℃保存反应产物直至分析。
8. 准备 6%～8%（*m/V*）非变性聚丙烯酰胺胶，用 1×TBE 缓冲液作溶剂（单元 7.2）。10V/cm 跑垂直胶 1～2h，每个样品的反应产物在相邻的泳道，这样可以对甲基化和非甲基化位点之间进行直接的比较。包括阳性和阴性对照。
9. 用溴化乙锭染胶，在 UV transilluminator 观察并对胶进行拍照（附录 3G）。一般情况下，产物的范围是 80～200bp。

基本方案 2　确定甲基化特异性 PCR 产物中 CpG 位点的甲基化

可能能区别甲基化和非甲基化序列的合适的酶如表 10.5.1 所示。必须检测 PCR 产物以确定这些限制位点是保留的还是重亚硫酸盐处理后产生的。

表 10.5.1　对重亚硫酸盐修改后的 PCR 产物[a] 进行限制性分析的酶

限制酶	没修改的序列	甲基化修改的序列	非甲基化修改的序列
*Bst*U Ⅰ	CGCG	CGCG*	TGTG
Taq Ⅰ	TCGAor CCGA	TCGA*	TTGA
*Sna*B Ⅰ	CACGCA	TACGTA*	TATGTA
Hph Ⅰ	GGCGA	GGCGA	GGTGA*

a. 在原始序列中下画线标记的 C 可能被 T 取代；星号标记的表示被限制性内切核酸酶的识别的位点。

材料（标√的条目参见附录1）

甲基化特异性PCR（MSP）产物（基本方案1）
适合的限制性内切核酸酶和缓冲液
牛血清白蛋白（如果需要）
10mg/ml 糖苷配糖基
100%和70%的乙醇，冰冻
√1×甲酰胺上样缓冲液

1. 在1.5ml管中加入10μl MSP产物。加入15μl 10×限制性内切核酸酶和缓冲液，需要的话加BSA，加水至150μl。加入10～20U适合的限制性内切核酸酶。按照操作手册推荐的条件反应4～6h。
2. 加入1μl 10mg/ml 糖苷配糖基（作为载体）和3体积冰冻的100%的乙醇。－20℃，沉淀DNA几小时或过夜，离心20min，去上清，用冰冻的70%的乙醇清洗，离心5min，去上清液，干燥沉淀。加入10～12μl 1×甲酰胺上样缓冲液溶解DNA。
3. 通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析（单元7.2）。生成一幅预测的PCR产物的限制性酶谱用于估计消化片段的大小以及聚丙烯酰胺凝胶的浓度。跑胶时再把没消化的PCR产物点在消化的PCR产物旁边的泳道，对限制性酶谱进行比较。用溴化乙锭染胶，在UV transilluminator观察并对胶进行拍照（附录3G）。对条带谱进行分析，找到反映甲基化的序列差异。

参考文献：Frommer *et al.*，1992；Herman *et al.*，1996；Kubota *et al.*，1997
编者：James G. Herman and Stephen B. Baylin

第11章 转 录 谱

单元 11.1 介绍了用于表达调控研究的 mRNA 的准备，包括制备、纯化和定量标记用于寡核苷酸分析的 cDNA 探针的方法。本单元还描述了几种处理和标准化基因表达原始数据的方法，以用于聚类分析和进一步的分析。

单元 11.2 描述了 cDNA 芯片在人类基因表达分析中的用途。制备 cDNA 芯片的方法之一是用一个特制的打印机将扩增的 cDNA 转移至显微镜载（玻）片上。标记 cDNA 探针的制备以及与芯片的杂交也有所描述。

在过去的 10 年间，关于 DNA 序列和基因定位的数据及其相关文献的数量在急剧增长。在今后的几年，随着参加人类基因组计划的实验室不断发布新结果，相关数据很可能继续呈指数增长。随着数据被海量积累，对其进行必要的收集、组织、使用和分析显得日益重要。结果，各种存储序列和基因定位信息的数据库应运而生。在整合这些数据库资源方面也取得了重大的进展。许多软件系统被设计用于检索、使用和分析这些数据，为这些信息提供电子接口。

单元 11.3 提供了一个分析大量表达分析实验数据的方法概述。

编者：Nicholas C. Dracopoli

单元 11.1 用于表达监测的寡核苷酸分析

注意：本单元中所用的溶液均用 DEPC 水处理的玻璃容器蒸馏水。

基本方案 1 用于表达监测的 mRNA 的扩增及其与寡核苷酸分析芯片的杂交

操作流程见图 11.1.1。疑难解析见本单元末（表 11.1.2）。

扩增完全取决于纯净、完整的起始 RNA。使用含胍的裂解液从培养的细胞中提取 RNA，用树脂过滤纯化（如 Qiagen RNeasy kit）。作者使用一步法方案（胍和酚混合使用）所提取的 RNA 质量不稳定。组织马上在液氮中速冻，使用干冰预冷的研钵和杵将速冻的组织研磨成粉末。RNA 在 Polytron 搅拌器中先后使用胍溶液和酚（如 Promega 公司的 RNAgents kit、Ambion 公司的总 RNA kit）抽提。

本方案使用 oligo（dT）引物制备富含 3′端的长 mRNA。因此，推荐引物所在的芯片是定制的或购买的。引物一般选取编码序列的末尾 600 个碱基。除非在特殊情况下，3′-UTR 区长于 800 个碱基，这时一些非翻译序列也可包含在内。

材料（带√的条目参见附录 1）

Superscript cDNA kit (Life Technologies)，包含：

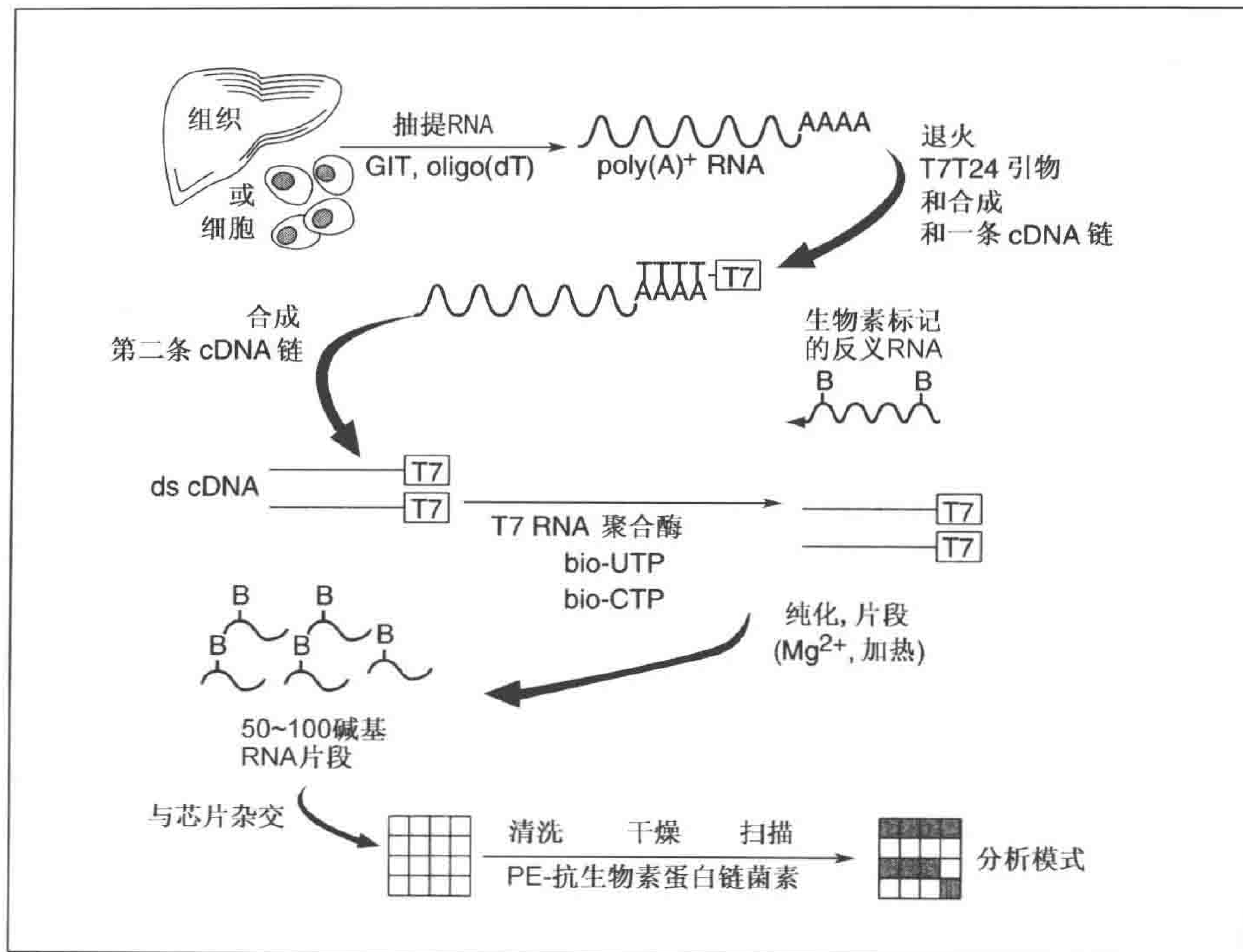


图 11.1.1 芯片分析流程图。简称：GIT，异硫氰酸胍；PE，藻红蛋白；SPRI，固相可逆固定。

5×第一链缓冲液

200U/μl Superscript Ⅱ 反转录酶

5×第二链缓冲液

10mmol/L dNTP

10U/μl *E. coli* 连接酶

2U/μl *E. coli* RNA 酶 H

10U/μl *E. coli* DNA 聚合酶

5U/μl T4 DNA 聚合酶

T7T24 引物：5′-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3′（建议用 HPLC 纯化）

RNA 酶抑制剂（Life Technologies 或 Ambion）

√DEPC 处理的 H_2O

样品 RNA poly A^+或总 RNA

制备对照转录池（支持方案 1）

√25∶24∶1（*V/V/V*）酚/氯仿/异戊醇（分子生物学级）

√7.5mol/L 乙酸铵

乙醇

70%（*V/V*）乙醇，用 DEPC 处理的水配制，预冷至－20℃

10×转录缓冲液（Ambion）

√10×rNTP 混合液

√100mmol/L dithiothreitol（DTT）

10mmol/L Bio-11-CTP 和 Bio-11-UTP（Enzo Diagnostics）

2500U/μl T7 RNA 聚合酶（Epicentre）

RNeasy 微柱及 RCT 和 RPE 缓冲液和收集管（Qiagen）

√5×片段缓冲液

√12×MES 缓冲液

5mol/L NaCl

√0.5mol/L EDTA

10%（V/V）Tween-20（Pierce）

√50mg/ml 牛血清白蛋白（BSA）

√10mg/ml 鲑鱼精 DNA（Promega）

√500pmol/L Bio948

20×杂交对照转录池（支持方案 1）所有的温控反应均用热循环仪（如带预热盖的 Perkin-Elmer 9600 PCR 仪）完成

0.1～10μl Tip 头（Continental）

冻干机

薄壁小 PCR 管基因芯片（Affymetrix）

1～200μl 上样 Tip 头（Fisher）

40℃和 50℃烤箱

漩涡混合器

1. 如下在热循环仪上设置链接程序：

10min	70℃
65min	37℃（或 50℃用于总 RNA）
150min	15.8℃
∞	4℃。

2. 如下用 0.1～10μl Tip 头为样品 RNA 配备 10μl 第一链反应混合物：

   4μl 5×第一链缓冲液；

   200pmol T7T24 引物；

   1μl RNA 酶抑制剂；

   1μl 200U/μl Superscript Ⅱ 反转录酶；

   DEPC 处理的 H_2O 加至总体积为 10μl。

3. 将每种样品 RNA 与制备的对照转录池混合。每 1μg poly A^+ RNA 样品加入 5μl 制备的对照池，或者每 10～20μg 总 RNA 加入 1μl 对照池。冻干至每管体积＜10μl，但不要完全冻干。DEPC 处理的 H_2O 加至总体积为 10μl。同时，用手预热第一链反应混合物。

4. 将各种 RNA 样品转移至薄壁小 PCR 管，置于热循环仪中。开始设置好的链接程序。在第一步 70℃完成后，等 2min 使 PCR 管内溶液降至 37℃（或 50℃），加入预热的

第一链反应混合物（10μl/管）保持适宜的反应温度 60min。

5. 准备第二链反应混合物 130μl/管（预先配制，置冰上 ≤90min）：

   91μl DEPC 处理的 H_2O；

   30μl 5×第二链缓冲液；

   3μl 10mmol/L dNTP；

   1μl 10U/μl *E. coli* 连接酶；

   1μl 2U/μl *E. coli* RNA 酶 H；

   4μl 10U/μl *E. coli* DNA 聚合酶。

6. 在热循环仪反应至 15.8℃后，每管加入 130μl 的第二链反应混合物（至总体积 150μl），用移液器轻轻吹打混匀。15.8℃孵育≥2 h。加入 5U/μl T4 DNA 聚合酶 2μl，继续孵育 5min。将样品置于冰上。

7. 加入 25：24：1 酚/氯仿/异戊醇 150μl，振荡混匀，室温 13 000*g* 离心 5min。上层水相转移至新 PCR 管，注意避免中间界面的污染。

8. 加入 7.5mol/L 乙酸铵 70μl 和乙醇 0.5ml ，混匀。室温 13 000*g* 离心 20min。去上清。用 0.5ml 冰冷的 70% 乙醇洗沉淀。振荡混匀。室温 13 000*g* 离心 10min，去上清液，空气干燥几分钟。25μl DEPC 处理的 H_2O 重悬 cDNA 沉淀，定量 cDNA（支持方案 2）。

9. 为每个 cDNA 样品配制如下反应混合液（或预先配制除样品 cDNA 以外的其余成分，置冰上≤3h，在加入样品 cDNA 前使其回温至室温）：

   100ng cDNA（不要多加）；

   6μl 10×转录缓冲液；

   6μl 10×rNTP 混合液；

   3μl 100mmol/L DTT；

   2.4μl 10mmol/L Bio-11-UTP；

   2.4μl 10mmol/L Bio-11-CTP；

   2μl RNA 酶抑制剂；

   2μl 2500U/μl T7 RNA 聚合酶；

   DEPC 处理的 H_2O 加至总体积为 60μl。

   37℃孵育 8h 至过夜。若有需要可在纯化前于 －80℃保存≤48h。

10. DEPC 处理的 H_2O 加至总体积为 100μl，加入 RLT 缓冲液 350μl（不含 2-巯基乙醇），混匀。加入 250μl 乙醇，混匀。上样至外套收集管的 RNeasy mini 柱。室温 8000*g* 离心。

11. 转移柱子至一新收集管。加入 500μl RPE 缓冲液。室温 8000*g* 离心。加入 500μl RPE 缓冲液，室温最高速离心 2min。

12. 转移柱子至一新收集管。加入 50μl DEPC 处理的 H_2O，＞8000*g* 离心 1min 。重复洗脱步骤，合并两次洗脱液。用分光光度计于 260nm 确定体外转录（IVT）RNA 的产量（附录 3D）。

13. 将 10μg RNA 用 DEPC 处理的 H_2O 加至总体积为 24μl。加入 6μl 5×裂解缓冲液。小心混匀，95℃孵育 35min 。冷却至室温。－80℃保存裂解的 RNA 不超过 1 年。

使用前于 37℃融解 5min。

14. 配制 2×MES 杂交缓冲液：

8.3ml 12×MES 缓冲液；

17.7ml 5mol/L NaCl；

4.0ml 0.5mol/L EDTA 0.1ml 10% Tween-20；

18.9ml DEPC 处理的 H_2O；

1.0ml 50mg/ml BSA。

65℃加热 10min。0.2μm 滤器过滤。−20℃保存。

15. 为每个反应配制如下 170μl 杂交 master 混合液：

100μl 2×MES 杂交缓冲液；

1.7μl 10mg/ml 鲑鱼精 DNA ；

20μl 500pmol/L Bio948；

10μl 20×杂交对照转录池；

38.3μl DEPC 处理的 H_2O。

16. 向 30μl 裂解的 RNA 加入 170μl 杂交 master 混合液。99℃加热 10min，37℃孵育≥5min。最高速离心 5min。

17. 将一个 Tip 头插入基因芯片的上层隔膜作为开口。用 1～200μl 上样 Tip 头将 161.7μl 杂交混合液从芯片的底层隔膜注入。去除开口，用透明胶带封闭上层和底层隔膜。每个 IVT RNA 使用一个基因芯片。

18. 置于振荡器上，约 60r/min，40℃烤箱孵育过夜（16～18h）。将芯片转移至 50℃烤箱，继续置于旋转仪上旋转 1h。将芯片从烤箱中取出，将一个 Tip 头插入其上层隔膜给芯片开一个口。

19. 使用移液器，将其活塞推至底部，将一个 200μl 的上样 Tip 头插入下层隔膜。将芯片垂直，吸出所有的杂交溶液至一微量离心管，于 −20℃保存。

20. 将芯片注满 1×MES 杂交缓冲液。按照产商的要求清洗芯片并染色，尽快扫描。若不能马上清洗芯片，用透明胶带封闭上下隔膜，可于 4℃保存几个小时。若芯片被染色后不能马上扫描，可包裹于铝箔中 4℃保存数小时。

21. 处理数据并评估产量（基本方案 2）。

支持方案 1　对照基因的体外转录和转录池的制备

附加材料（基本方案 1）

质粒（表 11.1.1；ATCC ＃87482 至 ＃87490）

25mmol/L 4rNTP 混合液：溶于 DEPC 处理的 H_2O 的 rGTP、rCTP、rATP 和 UTP 各 25mmol/L（Ultrapure 公司；Amersham Bioscience 公司）

2500U/μl T3 RNA 聚合酶（Enzo Diagnostic 公司）

表 11.1.1　质粒模板对照的制备

名称[a]	ATCC#	转录本大小/kb	正义链 RNA		反义链 RNA	
			线性化所用酶	合成所用酶	线性化所用酶	合成所用酶
pGIBS-LYS[b]	87482	1.0	*Not* Ⅰ	T3		
pGIBS-PHE[b]	87483	1.3	*Not* Ⅰ	T3		
pGIBS-THR[b]	87484	2.0	*Not* Ⅰ	T3		
pGIBS-TRP[b]	87485	2.5	*Not* Ⅰ	T3		
pGIKS-BioB	87487	1.1			*Xho* Ⅰ	T7
pGIKS-BioC	87488	0.8			*Xho* Ⅰ	T7
pGIKS-BioD	87489	0.7			*Xho* Ⅰ	T7
pGIKS-CRE	87490	1.0			*Xho* Ⅰ	T7

a. 缩写：BioB、BioC 和 BioD 分别是大肠杆菌的 bioB、bioC 和 bioD 基因的克隆片段。LYS、PHE、THR 和 TRP 分别是枯草芽孢杆菌 lysA、pheA、thrBC 和 trpEDCF 基因的克隆片段。CRE 是大肠杆菌噬菌体 PICre 重组酶基因的克隆片段。pGIBS 和 pGIKS 来源于 Bluescript KS Ⅱ 载体(Stratagene 公司)。

b. pGIBS-LYS、-PHE、-THR 和-TRP 在各自的枯草芽孢杆菌基因组片段的 3′加了 40 个核苷的 poly A 尾。在 T3 转录前将质粒用 *Bam*H Ⅰ 线性化将合成不带 poly A 尾的正义转录本。

1. 制备线性化的质粒模板（表 11.1.1）并纯化（基本方案 1，第 7～8 步）。用 DEPC 处理的 H_2O 重悬沉淀至约 0.1mg/ml，定量 DNA（支持方案 2）。
2. 为标记的杂交对照转录本配制如下 4 管混合液（或预先配制，置冰上≤3h，在后续操作前使其回温至室温）：
   6μl 10×转录缓冲液；
   6μl 10× rNTP 混合液；
   3μl 100mmol/L DTT；
   2.4μl 10mmol/L Bio-11-UTP；
   2.4μl 10mmol/L Bio-11-CTP；
   2μl RNA 酶抑制剂；
   2μl 2500U/μl T7 RNA 聚合酶；
   DEPC 处理的 H_2O 加至总体积为 60μl（包含第 4 步的 100ng DNA）。
3. 为未标记的合成转录本按第 2 步配制 4 管反应液，注意如下差别：
   用 25mmol/L 4rNTP 混合液代替 10×rNTP 混合液；
   除去生物素标记的核苷；
   用 T3 RNA 聚合酶代替 T7 RNA 聚合酶 。
4. 向每管分别加入一种线性化的质粒 DNA 100ng（不要多加），37℃孵育 8h 至过夜。体外转录（IVT）的 RNA 可于－80℃保存。纯化产物（备选方案）并用 A_{260nm}确定产量（附录 3D）。
5. 用 DEPC 处理的 H_2O 将未标记的合成的对照转录本稀释至 200nmol/L 用于长期保存（－80℃保存不超过 1 年）。如下用 DEPC 处理的 H_2O 配置转录池（分装至 50～100μl 每管，－80℃保存不超过 6 个月）：
   10pmol/L LYS 转录本；
   30pmol/L PHE 转录本；

90pmol/L THR 转录本；

180pmol/L TRP 转录本。

6. 片段化生物素标记的杂交对照转录本（基本方案 1，第 13 步）。在 1×MES 杂交缓冲液中用鲑鱼精 DNA 稀释至 20nmol/L 用于长期保存（−80℃保存不超过 1 年）。如下（在同样的缓冲液中与鲑鱼精 DNA 混合）配置 20×转录池（ −80℃保存不超过 6 个月）：

   30pmol/L 片段化的 BioB 转录本；

   100pmol/L 片段化的 BioC 转录本；

   500pmol/L 片段化的 BioD 转录本；

   2nmol/L 片段化的 CRE 转录本。

备选方案　固相可逆固定纯化 cDNA 和体外转录产物

这种纯化 cDNA 或 IVT RNA 的方法与在基本方案 1（第 7～8 步或第 10～12 步）中所描述的方法效果相当，但很容易实现自动化。

材料（标√的条目参见附录 Ⅰ）

羧基包被的磁珠（用于 cDNA 纯化的 PerSeptive BioSystems；IVT 纯化的 Bangs 实验室）

√0.5mol/L EDTA

纯化的样品：cDNA 反应混合液（基本方案 1，第 6 步）或 IVT RNA 反应混合液（基本方案 1，第 9 步，支持方案 1，第 4 步）

2.5mol/L NaCl/20%（*m/V*）PEG 8000（分子生物学级，无 RNA 酶）

70%（*V/V*）乙醇（用 DEPC 处理的 H_2O 配制）

10mmol/L Tris 乙酸，pH7.8（无 RNA 酶）

磁性座子（CPG）

cDNA 纯化

1a. 置 10μl PerSeptive 羧基包被的磁珠于一 1.5ml 微量离心管中。将管子置于磁性座子上使得磁珠分离至管壁。用移液器小心除去上清液。

2a. 加入 10μl 0.5mol/L EDTA 重悬磁珠，轻微振荡或吹打。将离心管置于磁性座子上，等磁珠分离后，去除上清液。重复两次。用 10μl 0.5mol/L EDTA 重悬磁珠。

3a. 每 150μl cDNA 反应混合液加入 150μl 2.5mol/L NaCl/20% PEG 8000 和 10μl 重悬的磁珠，轻微振荡或吹打混匀。室温孵育 10min。

4a. 将管子置于磁性座子上使得磁珠分离至管壁（最初的分离需约 2min，洗涤更快）。去除上清，用 150μl 70% 乙醇洗涤磁珠两次。尽量去除乙醇，空气干燥 2min。

5a. 加入 25μl 10mmol/L Tris 乙酸，pH7.8，室温孵育 5min。将离心管置于磁性座子上，保留上清液（如 eluted cDNA）。用 PicoGreen 荧光染色测定 cDNA 浓度（支持方案 2）。

IVT RNA 纯化

1b. 置 20μl 羧基包被的磁珠（Bangs 实验室制备）于一 1.5ml 微量离心管中。将管子置于磁性座子上使得磁珠分离至管壁。用移液器小心除去上清液。

2b. 加入 20μl 0.5mol/L EDTA 重悬磁珠，轻微振荡或吹打。将离心管重置于磁性座子上使磁珠分离，去除上清液。重复两次。用 20μl 1.25mol/L NaCl/10% PEG 重悬磁珠。

3b. 每 60μl IVT RNA 反应混合液加入 60μl 2.5mol/L NaCl/20% PEG 8000 和 20μl 重悬的磁珠，轻微振荡或吹打混匀。室温孵育 10min。

4b. 将管子置于磁性座子上使得磁珠分离至管壁（最初的分离需约 2min，洗涤更快）。去除上清，用 150μl 70% 乙醇洗涤磁珠两次。尽量去除乙醇，空气干燥 3min。

5b. 加入 25μl 10mmol/L Tris 乙酸，pH7.8，室温孵育 5min。将离心管置于磁性座子上，留上清液（如 eluted RNA）。用 A_{260nm}确定 RNA 产量（附录 3D）。

支持方案 2 cDNA 定量

材料

PicoGreen dsDNA Quantitation Kit (Molecular Probes)：
- 100ng/μl 标准 DNA 储存溶液
- 20×TE 缓冲液
- PicoGreen 试剂

待定量的 cDNA（基本方案 1 或备选方案）

黑壁的 96 孔板（Corning）

荧光计（Molecular Dynamics，model FSI）

1. 用 1×TE 缓冲液稀释储存溶液以配制 1ml 2μg/ml 稀释的标准 DNA。用 1×TE 缓冲液按 1：200（V/V）稀释 PicoGreen 试剂。配制足够 100μl /孔的稀释试剂。
2. 向黑壁 96 孔板中的 7 孔分别加入 100、50、20、10、5、2 和 0 μl 的稀释的标准 DNA。用 1×TE 缓冲液将每孔加至总体积为 100μl（标准 DNA 的终含量分别为 200、100、40、20、10、4 和 0ng/孔）。按需要，加 2μl 待定量的 cDNA 于一新孔。
3. 每孔加入 100μl 稀释的 PicoGreen 试剂，用荧光仪测荧光强度。
4. 按厂商的说明书读每孔的荧光强度值。根据每孔的荧光强度值对应的纳克数画出标准曲线。计算样品孔中 cDNA 浓度。

基本方案 2 数据分析与处理以及数量评定

1. 用 Affymetrix GeneChip 软件进行最初的数据处理。通过检测图像像素值，此软件测定每种寡核苷酸探针的荧光强度从而计算出每种转录本的简化值。此简化值被称为“平均差异”，它通过确定某一特定转录本在所有引物对中的特异信号而得（即将某一特定转录本由完全匹配的寡核苷酸引物所产生的信号值减去其由不完全匹配的寡核苷酸引物所产生的信号值）。平均差异值与某一特定转录本在所有转录本中的比例

呈正比。GeneChip 软件还可进行质量评估，又成为“绝对结果”，从而判断某一特定转录本在样品中的有或无。

2. 要比较某一基因在多种实验下的平均差异有必要标准化不同批次间的表达量。有几种方法可以进行。GeneChip 软件提供了两种方法：“标准化”用于减少或消除相同实验设计但反应条件不同的数据差异，而“标度”将不同实验设计的平均差异调整至同一平均表达量。两种方法中，使用者都可以在同一张芯片上使用某种特定引物集或各种不同引物集。GeneChip 软件以外的第三种方法是根据已知浓度的转录本（杂交控制池）杂交所产生的平均差异值绘制标准曲线。这种方法可以不考虑试验设计的不同将同一批次的所有数据标准化，并可将平均差异转换为绝对浓度（mRNA 的分子数）。转换时，阴性对照的平均差异被默认为零。将可检测到的最低表达量水平设置为低或零平均差异值以排除假阳性结果是明智的。根据杂交对照池中关于已知转录本的相关数据，预估可检测到的最低表达量。绝对浓度低于预估值的视为阴性结果。GeneChip 软件将低于背景值 4 倍的数据值视为阴性结果。

3. 质量评估用于三大领域。

RNA 质量。商业化的基因芯片设计数据来自于公用数据库，3′-UTR 序列有时缺失。若探针位于 poly A^+ 尾 1500 个碱基以前，即使使用高质量的 RNA，也可能产生假阴性结果。若 RNA 部分降解或有污染物阻碍反转录反应，假阴性率增加。通过检测芯片上高丰度的基因，如 β-actin 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶，3′、中间和 5′ 探针所产生的转录本可评估 RNA 质量。当 5′与 3′转录本比值小于 0.5 时，假阴性率较高。

实验过程质量。从 RNA 样品中未标记 RNA 转录本的多少可监控 RNA 合成步骤的质量。合成对照池中各种成分的平均差异值应该与其在之中的相应浓度呈正比。此外，若在 GeneChip 软件中使用数据标准化，标准化后，使用相同引物集在不同批次中所产生的平均差异值应该相似，不应该出现结果的上下波动。

表 11.1.2 表达监控的疑难解析

问题	可能原因	解决方法
cDNA 产量低或无	反应的 RNA 质量不佳	检测 RNA 在凝胶中分子质量的大小。正常情况下，>5kb 的条带应该较浓，<500bp 的条带较淡
	RNA 或其他反应物中有 RNA 酶污染	室温孵育 RNA 几个小时，凝胶检测。其他反应物与经验证的 RNA 孵育，凝胶检测 在 cDNA 反应中加入 RNA 酶抑制剂
	RNA 制备中混入酶抑制剂	检查合成对照转录池中各成分的信号强弱。若 5′信号弱又没有证据显示存在 RNA 酶污染，按照方案重新抽提 RNA 并用更严格的方法纯化
IVT 产量低或无	cDNA 模板太少	定量 cDNA，每个 IVT 反应>50ng。若 cDNA 产量低，查阅上部分（cDNA 产量低或无）
	合成酶抑制剂污染	残余的酚/氯仿或 dNTP 能够抑制合成酶反应。重新沉淀 cDNA，用 70%乙醇小心洗涤沉淀
	使用的合成酶不对	确保合成酶与启动子相匹配
	DTT 失活	配制新鲜 DTT 储液

续表

问题	可能原因	解决方法
	核苷酸浓度太低	若合成无标记的 RNA，确保用 25mmol/L 4rNTP 溶液代替含有生物素标记核苷酸的 10×rNTP 混合液
基因新片信号弱或无	RNA 质量不佳	即使合成足量的 cDNA 和 IVT，RNA 质量不佳仍然可能导致芯片信号不好。检验管家基因 5′ 和 3′信号比值。使用 oligo(dT)纯化的 cDNA、β-actin 和 GAPDH[a] 基因 5′ 信号应至少是 3′信号的一半
	反应条件太苛刻	检查孵育器温度和缓冲液
	与 streptavidin 结合的生物素着色太浅，或藻红蛋白被漂白	SA-PE[a] 试剂效果减弱或消失。换另一批号的试剂或增加着色溶液中 SA-PE 的量。SA-PE 避光储存。扫描前用铝箔包裹芯片，防止漂白
	扫描波长不正确	确保扫描仪被设置在 560nm，重新扫描
	溶液中含有杂交抑制剂	在同批号的另一块芯片上使用相同的杂交液。若信号增强，可能需要采用预杂交
	扫描仪需要调整	要求相关服务；若可能，使用另一台扫描仪
	基因芯片批次有问题	将保存的杂交液与已确证有强信号的芯片重新杂交。若信号增强，杂交抑制剂不存在，与厂商联系
同一基因，有的信号非常强，其余的非常弱	片段化反应失败	核查 5×fragmentation 缓冲液以及 94℃温控单元。若有额外的 IVT RNA，重复片段化反应，用凝胶检测。片段大小应该为 20～50 碱基
背景值高	反应条件太宽松	将芯片在调高的温度中重新洗涤后重新扫描
	有污染	推荐用玻璃制品蒸馏得来的水配制杂交溶液。某些去离子系统有问题。若水的质量不可靠，可用商业化的蒸馏水
芯片上零星布满圆点	SA-PE[a] 聚集	厂商建议在分装前将溶液振荡并离心 2min
与其余区域相比，芯片中间的圆形区域信号很弱	杂交溶液体积太小	至少需要 180μl。若不能重新配制，向保存的杂交溶液加入 1 ×MES，0.1mg/ml herring sperm DNA，0.5mg/ml BSA，直至体积达到 200μl，然后与新芯片重新杂交
	杂交过程中，旋转仪停止	与新芯片重新杂交并确保旋转仪工作正常

a GAPDH，甘油醛-3-磷酸盐脱氢酶；SA-PE，streptavidin-phycoerthyrin。

芯片性能。与 RNA 不完整一样，芯片性能不佳也能导致假阴性。标记的杂交对照池可指示每块芯片不同的灵敏度。这个对照池被广泛使用，其缺点在于低于 5.0pmol/L 时，它的指示能力不佳。为了大致确定检测范围，需要更多的对照转录本。或者采用标准曲线法标准化数据，每块芯片上所有基因的预计浓度将可与 GeneChip 提供的相应绝对结果进行配对，从而得出检测范围。

参考文献：Golub *et al.*，1999；Lockhart *et al.*，1996；Schena *et al.*，1995；

编者：Michael C. Byrne，Maryann Z. Whitley，and Maximillian T. Follettie

单元 11.2　用 cDNA 芯片分析人类基因表达

注意：若没有特别说明，所有的离心均在室温下进行（20～25℃）。

注意：在第一次使用前，所有与芯片接触的玻璃器皿必须仔细清洗并在 1mol/L 硝酸中浸泡，此后，单独放置，专用于芯片。

注意：若没有特殊说明，操纵 RNA 时，用去 RNA 酶的水（如 DEPC 处理的水，附录 1）配制所有溶液。

基本方案 1　cDNA 合成与印迹

cDNA 芯片是将合成的 cDNA 模板用特制的点样仪固定于微型载玻片而制成的。各种各样的点样仪和点样笔可将 PCR 产物从浓度滴定板转移至芯片，为了避免对此过程的螯述。此处的步骤（第 31～33 步）只做一般性描述。

材料（标√的条目参见附录 1）

母板：克隆后纯化并校验的人类表达序列母祖

细菌细胞中的标记（EST；如 gf211 版本，遗传学研究）

√LB 培养基（如 Biofluids 或附录 1）

√100mg/ml 氨苄青霉素

70% 和 100%（V/V）乙醇

100%（V/V）变性乙醇

Super 肉汤培养基（Biofluids）

45%（m/V）甘油（酶级），高压灭菌，室温保存

96 孔碱裂液 miniprep kit（Edge BioSystems）

　裂解缓冲液，室温保存

　RNA 酶溶液

　重悬缓冲液

　沉淀缓冲液

　中和缓冲液

　Wide-bore Tip 头

　96 孔接受板和滤过板深孔板

　深孔板

√T low E 缓冲液

10×PCR 缓冲液

100mmol/L dATP

100mmol/L dGTP

100mmol/L dCTP

100mmol/L dTTP

1mmol/L AEK M13F PCR 引物（5′-GTTGTAAAACGACGGCCAGTG-3′）
1mmol/L AEK M13R PCR 引物（5′-CACACAGGAAACAGCTATG-3′）
5U/μl *Taq* DNA 聚合酶（AmpliTaq；PE Biosystems）
√乙醇/乙酸盐溶液
√20×SSC
琥珀酸酐（Sigma）
1-甲基-2-吡咯酮（sigma）
√1mol/L 硼酸盐溶液，pH8.0
96 深孔板和 V 形塑料细胞培养皿（Corning）
容量为 6.2cm 的水平微量培养板离心（如 Sorvall Super T21，有 ST-H750 微量培养板转头），室温和 4℃
96 孔多位点复制针（V&P Scientific）
1 加仑储存袋（如 Glad Lock）
多微孔的带层（如 AirPore 带层；Qiagen）
带孔的振荡器用于深孔板，37℃
消毒密封的 96 孔板（如 Elkay Products）
薄 96 孔 PCR 孔板和密封的 PCR 板（如 CycleSeal 密封板；Robbins Scientific）
96 孔加热循环控制装置（MJ Research）
微滴定率冲洗板（如 Immunowash Microplate washer；Bio-Rad）
加热储存袋和热的封闭剂
65℃培养箱
智能玻片打印机（如 GeneMachines、Genetic Microsystems、Genetix、Cartesian-Technologies）和打印笔（如 Majer Precision Engineering、TeleChem International）
菱形划线用于玻片写入
没有纸的塑料玻片盒（如 PGC Scientifics）
24cm×34cm×5cm 耐热玻璃烘烤盘
30cm 片不锈钢支柱和小烧杯（Shandon/Lipshaw）
水域箱
1L 烧杯

1. 密封的低密度标准培养基中 37℃培养过夜（大部分卖方提供低密度培养基）。如果已经高密度培养过可以省去这个步骤，否则会降低活性。
2. 准备重复的 96 孔板分别标记，每孔中加入 100μl 的含 100μl/ml 氨苄的培养基。（通过氨苄抗性检查 EST 克隆）标记孔板以方便辨认。

   为保存孔板，一种工作孔板被用做培养基来源（第 2～5 步）。

3. 在水平微量培养板离心机上 167*g* 离心 2min，弃上清。
4. 将 96 孔多位点复制针浸入纯乙醇溶液中，火烧。冷却后挑克隆于装有 LB 的孔板中，可重复操作确保接种。
5. 将孔板置于含湿润带层的 1 加仑储存袋中 37℃培养过夜。

6. 在 96 孔板中加入 1ml 含 100μl/ml 氨苄的 Super Broth 中。用多位点复制针接种到新鲜的 LB 中，盖上盖后在深孔板振荡器上 200r/min 37℃摇 24h。
7. 每孔中加 50μl 45%灭菌甘油，－80℃保存。
8. 预温裂解液（来自裂解试剂盒）于 37℃直到 SDS 溶解。加入 1ml RNase 于 100ml 重悬液中，4℃保存。
9. 每孔中加 350μl 100%变性乙醇（来自试剂盒）。盖上滤纸，小心操作以防孔板装得太满。
10. 1500*g* 离心 7min。迅速倒置弃上清后换上一张干净的滤纸。要迅速，否则沉淀将浮起或移动。
11. 每孔加入 100μl 含 RNase 的重悬液重悬。全部重悬后加入 100μl 裂解液，轻轻混匀避免振荡染色体 DNA。
12. 每孔加入 100μl 沉淀液，充分混匀后加 100μl 中和液。混匀后转移到试剂盒提供的孔板里。
13. 1500*g* 离心 12min。弃上清后加乙醇洗后滤出。用滤纸吸干多余的乙醇。
14. 每孔中加入 500μl 70%乙醇。迅速倒掉，吸掉多余的乙醇。将孔板放置于一干净容器中，盖上干净滤纸过夜。
15. 重悬 DNA 用 200μl T low 溶液。密封让其在 4℃溶解至少 2d 才能用。质粒保存温度为－20℃。
16. 扩增 96 孔板中的 DNA，以下是 PCR 反应试剂：
    1000μl 10×PCR 缓冲液；
    20μl 100mmol/L dATP；
    20μl 100mmol/L dGTP；
    20μl 100mmol/L dCTP；
    20μl 100mmol/L dTTP；
    5μl 1mmol/L AEK M13F 引物；
    5μl 1mmol/L AEK M13R 引物；
    100μl 5U/μl *Taq* DNA 聚合酶；
    8800μl H_2O。
17. 标记薄 96 孔 PCR 板，标记供体和受体板在板的 A1 孔处以确定方向。
18. 每孔中加 100μl PCR 反应混合试剂。轻轻加入确定孔底没有气泡后，每孔中加入 1μl 纯化的 EST 质粒模板。确定模板都加入到了 PCR 反应试剂中。
19. 以下是循环体系：

1 个循环：	30s	96℃	（预变性）
25 个循环：	30s	94℃	（变性）
	30s	55℃	（退火）
	150s	72℃	（延伸）
1 个循环：	30s	72℃	（终止）

    完成 PCR 后将孔板保存在 4℃。
20. 用 2%的琼脂糖胶电泳 2μl 的 PCR 产物，选用适当大小的分子标记（支持方案 1）。

如果扩增产物已经被证实了，每个孔板只要分析一排就够了。

21. 选取孔板中一排中的一个孔，用荧光测定法分析 1μl 扩增产物（支持方案 2）。
22. 每孔加 200μl 乙醇/乙酸盐溶液于 96 孔 V 形底板。再每孔中加 100μl PCR 产物进行纯化，用移液枪混匀 4 次。
23. 于－80℃培养＜1h 或于－20℃＞1h 过夜，充分溶化。
24. 4℃下 2600g 离心 40min。弃上清，留 10～20μl 在底部避免吸到沉淀。
25. 用 200μl 70％乙醇洗沉淀，4℃下 2600g 离心 40min。吸去上清让其在一封闭容器中风干过夜。不要用快速蒸发器。
26. 每孔中加 40μl 3×SSC，小心密封孔板。将孔板置于加热储存袋中。将加热储存袋放置在 65℃培养箱中 2h，之后让其自然冷却。
27. 选取孔板中一排中的一个孔分析 1μl 提纯的重悬 PCR 产物用 2％的琼脂糖胶跑胶（支持方案 1）。查看跑胶条带。产物于－20℃保存。
28. 在转移 PCR 产物到玻片前，详细参看打印笔的说明。
29. 用多聚 L-赖氨酸包被玻片（支持方案 3）。
30. 将溶解的纯化 PCR 产物 167g 离心 2min。转移 5～10μl PCR 产物于孔板中，这将作为打印的原液。

    四列直插式打印笔能产生连贯的小点，液体体积要少，打印笔深不能超过 1mm。

31. 带有 DNA 溶液和连续沉积溶液的笔在玻片上打点。用重复的打印检查玻片上点的大小和位置。同样证实了笔能携带溶液并打点，这样简单的负荷物能产生出我们所需要的玻片。
32. 如果一个或者更多的笔没有在要求的水平，重新清洗或者换另一个笔重新检测。如果所有的笔都显示了，进行全部的印记。
33. 印记最后，从印记仪上取下片子，在片子边缘用玻璃刀标明编号和印记标记。并用玻璃刀刻线来标明这片子在第一块片子上的印记区域。将片子放到清洁的玻片盒，可存放一周。
34. 将片子印记的一面向上放置，在一个约 24cm×34cm×5cm Pyrex baking 皿中，盖上塑料盖。将片子用 450mJ 强度的紫外线照射。将片子转移到不锈钢架子上，并将架子置于小的玻璃容器中。
35. 溶解 6.0g 琥珀酸酐于 325ml 1-甲基-2-吡咯酮在玻璃容器中，用玻璃棒搅拌加速溶解。

    注意：无菌手套应预热，并且操作 1-甲基-2-吡咯酮（一种致癌剂）应在化学防护通风橱内进行。

36. 加 25ml 1mol/L 硼酸钠缓冲液到烧杯中。搅拌混合几秒钟，然后迅速倾倒到放片子的玻璃容器中。将玻璃容器放到摇床，70～90r/min 摇 20min。
37. 浸片子到沸水中。立即关掉加热器，让片子在热水中孵育 2min。将片子转移到 1L 盛有无水乙醇的玻璃容器中孵育 4min。
38. 转移片子到水平离心机中，167g 离心 3min。转移片子到一个清洁的片子盒，竖直放置过夜，准备杂交。

基本方案 2 RNA 抽提和标记

从细胞中提取出的 mRNA 被荧光核苷酸标记。在标记 cDNA 时，使用 poly（dT）或者锚定的 poly（dT）所得到的结果是相同的。某些类型的细胞可能和锚定 poly（dT）结合的信号更强。

材料（标√的条目参见附录 1）

组织分离的细胞、组织培养的细胞或者冻存的组织
√PBS
TRIzol 试剂（Life Technologies）
氯仿
100%、75%和 70%（V/V）乙醇
RNeasy Maxi 试剂盒（Qiagen）
  50ml Maxi 旋转柱和收集管
  RW1 缓冲液
  RPE 缓冲液
√经 DEPC 处理的水（试剂盒或附录 1）
√3mol/L 乙酸钠，pH5.2
引物（选择一个）：2μg/μl 锚定的寡聚核苷酸（dT）引物（5′-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV N-3′；如 Genosys）或者 1μg/μl 聚合（dT）12～18（Amersham Biosciences）
200U/μl Superscript Ⅱ RNase H$^-$ 反转录酶，包括 5×第一链缓冲液和 1mol/L DTT（life Technologies）
√10× low-T dNTP 混合物
1mmol/L Cy5-dUTP 或者 Cy3-dUTP，－20℃保存（避光）
30U/μl RNase 抑制剂（如 RNasin；Promega）
√0.5mol/L EDTA，pH8.0
1mol/L NaOH
√1mol/L Tris·Cl，pH7.5
√TE 缓冲液，pH7.5
1mg/ml 人 Cot-1 DNA（Life Technologies）
组织匀浆机（如 Polytron PT1200；Brinkmann Instruments），只在做组织时使用
15ml 圆底离心管
50ml 圆锥底离心管
水平离心机
Microcon YM-100 filter unit（Amicon）或替代物
0.2ml 薄壁 PCR 管
热循环仪
荧光扫描仪（如 Storm 系统；Molecular Dynamics）

1a. 从组织培养收获的细胞：用 PBS 将细胞团洗两遍。

1b. 组织培养的细胞：每 2×10^7 细胞中加入 1ml TRIzol，摇匀。

1c. 冻存的组织：加 100mg 冻存的组织到 4ml TRIzol，然后用组织匀浆器打碎为匀浆状。

2. 加 1/5 体积的氯仿，摇 15s，静置 3min。4℃ 12 000g 离心 15min。弃上清，转移到一个 15ml 离心管，标记体积。

3. 逐滴加入等体积 70％乙醇，边加边摇匀。为防止 RNA 聚集，注意每滴混匀后再加入下一滴。

4 . 置 RNA Maxi 柱子于 50ml 离心管，再加入 2×10^7～1×10^8 个细胞的上清液。水平离心机 2880g 离心 5min。收集滤出液，再加到柱子中，重新离心一次。

5. 弃滤出液，向柱子中加 15ml RW1 缓冲液，离心。10ml RPE 缓冲液洗两次，后一次离心 10min。弃滤出液。

6. 置柱子于新 50ml 离心管上，加 1ml 经 DEPC 处理的水，静置 1min，2880g 离心 5min；不要弃滤出液。再加 1ml 经 DEPC 处理的水，静置 1min，离心 10min。

7. 将滤出液分装到 1.5ml 离心管中，每管 400μl。每管中再加 40μl 3mol/L 乙酸钠（pH5.2）和 1ml 无水乙醇，混匀，室温静置 15min。4℃ 12 000g 离心 15min。75％乙醇洗脱两次，置 75％乙醇中－70℃保存。

8. 4℃ 12 000g 离心 15min，弃上清，风干，经 1mg/ml 处理的水重悬。通过测定 1μl RNA 在 100μl 50mmol/L NaOH 的 A_{260}的值来确定 RNA 浓度。

9. 用 Microcon YM-100 500g 过滤，可将其浓缩到 7mg/ml 以上，根据实验需要选择合适的浓缩比例。－80℃储存。

10. 在 0.2ml 薄壁 PCR 管中进行 RNA 引物退火。用 2μg/μl 锚定引物或者 1μg/μl poly（dT）12～18 引物（两次使用相同体积）。

体系	Cy5 标记	Cy3 标记
总 RNA（＞7mg/ml）	150～200μg	50～80μg
引物	1μl	1μl
经 DEPC 处理过的水	至 17μl	至 17μl

65℃加热 10min，冰上冷却 2min。

11. 按下列组分配制基本混合物（23μl 每反应）。当使用 Superscript 聚合酶时，小心避免产生泡沫以防止酶变性。

8μl 5×第一链缓冲液；

4μl 10×low-T dNTP 混合物；

4μl 1mmol/L Cy5-或 Cy3-dUTP；

4μl 0.1mol/L DTT；

1μl 30U/μl RNase 抑制剂；

2μl 200U/μl Superscript Ⅱ。

12. 加 23μl 反应混合物到每个样品，混匀，点离，42℃孵育 30min。再加 2μl Superscript Ⅱ，混匀，42℃孵育 30～60min。

13. 加 5μl 0.5mol/L EDTA 终止反应。加 10μl 1mol/L NaOH 65℃孵育 60min 水解残

留 RNA。冷却到室温。加 25μl 1mol/L Tri · Cl，pH7.5 中和反应。

NaOH 的纯度很重要。微量的污染物或者长时间在玻璃容器中保存都能降解 Cy5 染料分子，使溶液变黄。一些研究者将水解时间减少到 30min 得到了更好的结果。

14. 转移标记过的 cDNA 到 Microcon YM-100 盒中，加 400μl TE 缓冲液和 20μg 人 Cot-1DNA。吸管混匀后 500*g* 离心 10min。加 200μl TE 缓冲液用 Microcon YM-100 盒（500*g* 离心 8～10min）浓缩到 20～30μl。用先前的离心次数更保险，因为加太多的水会浓缩 cDNA 到滤膜上抑制它洗脱。另外的选择是使用 Speedvac 脱水器，但不能脱水到足够干。
15. 颠倒浓缩管到一个洁净的收集管中 500*g* 离心 3min，来复苏 cDNA 探针。

    有时，会发现被 Cy5 标记的 cDNA 凝胶样蓝色沉淀物。这是有污染物的证明。污染物越多，胶上得到的 cDNA 的片段越大。即使加热溶解，这些物质也会增加与 DNA 非特异性的结合。
16. 在 TAE 缓冲液中用 2～3μl 探针跑 2%（*m*/*V*）琼脂糖胶（6cm×8.5cm，用 2mm 宽胶孔；附录 3G）。为得到最大的敏感性，在转载染料中使用最少的染料并且不要加 EB 到胶或者跑胶缓冲液中。
17. 用荧光扫描仪（设置：红色荧光，200μm 分辨率，1000V PMT）扫胶。寻找浓的探针 smear 带，从 400bp 到大于 1000bp，和小的堆积起来的小分子质量的转录产物。微弱的标记和明显的低分子物质说明标记较差。显示低分子物质的片段不包含荧光核酸。

基本方案 3　杂交和数据提取

为了估计一种来源的 RNA 相对于另一种来源的 RNA 的独特信息的丰度，这两种标记的 RNA 在同一芯片上杂交。将足量的 cDNA 固定在片子上，以保证来自每个杂交探针的荧光与它们的相关丰度在细胞信息池呈比例。

两个通道间调节芯片成像仪，确定图像信号和规范数值的独特性上具有很大的差别。这部分（第 9～10 步）只是为考虑整体成像提供指导。

材料（标√的条目参见附录 1）

玻璃芯片（基本方案 1）
Cy3-和 Cy5-标记的 cDNA（基本方案 2）
√DEPC 处理水
8mg/ml Poly（dA）40～60（Amersham Biosciences）
√4mg/ml 酵母 tRNA
√10mg/ml 人 Cot-1 DNA
√20×SSC
√50×Denhardt 溶液
√10% SDS
√0.5×SSC/0.01% SDS 洗脱缓冲液

√0.06×SSC 洗脱缓冲液

0.2ml 薄壁 PCR 管

热循环仪

20mm×50mm 盖玻片

芯片杂交板

65℃水浴

临床离心机与卧式转子微量滴定板

芯片扫描仪

图像分析软件

1. 估计需要的杂交液的体积（很关键）。一般来说，按每平方毫米盖玻片面积 0.033μl 的量覆盖芯片（如 24mm×50mm 玻片用 40μl）。
2. 对一 40μl 的杂交体系，将 Cy3-和 Cy5-标记的 cDNA 加入一个 0.2ml 薄壁 PCR 管，加入 DEPC 处理水或者使用加速蒸发器去除水以调整至 30μl 体积；不要使用高热或热照明。
3. 混合下面的物质：

	对于 high sample blocking	对于 high array blocking
Cy5+Cy3 探针	30μl	28μl
8mg/ml poly（dA）	1μl	2μl
4mg/ml 酵母 tRNA	1μl	2μl
10mg/ml Cot-1 DNA	1μl	0μl
20×SSC	6μl	6μl
50×Denhardt 溶液	1μl（可选）	2μl

当芯片上对照重复的 DNA 样本的剩余杂交时，用 high sample blocking 配比。当在所有的芯片组件上有弥散背景或烟雾时，用 high array blocking 配比。作者一般先用 high sample blocking 配比。

4. 将混合物完全混匀，热循环仪上 98℃加热 2min，25℃快速冷却，加入 0.6μl 10% SDS。16 000g 离心 5min。将覆盖有杂交混合液的 24mm×50mm 盖玻片与倒转的芯片接触，小心避免气泡产生。在操作实际样品前先用缓冲液和平整的载玻片练习。
5. 将载玻片置于气密的芯片杂交板，加入 5μl 3×SSC 于蓄水池（如果杂交板有提供）或载玻片末端的刻线上，封闭杂交板。将此杂交板浸入 65℃水浴，杂交 16～21h。
6. 从水浴中拿出杂交板，冷却，小心干燥。打开杂交板，移掉载玻片。
7. 将仍然黏附有盖玻片的载玻片置于盛有 0.5×SSC/0.01% SDS 洗脱缓冲液的 Coplin 缸中。让盖玻片从载玻片上脱落，然后用镊子将盖玻片从 Coplin 缸中取走。冲洗载玻片 2～5min。将载玻片转入新的盛有 0.06×SSC 洗脱缓冲液的 Coplin 缸中。冲洗载玻片 2～5min。

   对更严格的冲洗，加入一个先用 0.5×SSC/0.01% SDS 的冲洗步骤或者重复正常的冲洗方法两次。

8. 转移载玻片至一载物片架上，在装有卧式转子微量滴定板的临床离心机上 167g 低速迅速离心 3min。不要在空气中干燥。

9. 将载玻片放入芯片扫描仪内，调节光电倍增管电压和镭射能量以使最亮的信号生成稍微少于最大可能的读数（如 65 535 对于 16bit 标准）且背景值（阵列点间）在零以下大体一致。收集整个图像的数据。
10. 将收集的图像输入图像分析软件检测整个杂交的质量，注意不一致处和背景层次，信号的层次和分布，每一信号通道的相关强度和大部分基因信号的相似性。

支持方案 1　EST 的琼脂糖凝胶电泳

材料（标√的条目参见附录 1）

1×TAE 缓冲液配制的 2%（m/V）琼脂糖凝胶（附录 3G）
√50×TAE 缓冲液
√EST 上样缓冲液
96 孔板的 PCR 产物（基本方案 1，第 20 和 27 步）
√100bp 长度的标准品
电泳参数采用容量为 4 个 50 孔的梳齿（如 Owl Scientific）
一次性的微量混匀盘（如 Becton Dickinson）
可编程的、12 通道的移液器和一次性吸头（如 Matris Technologies）

1. 将 1×TAE 缓冲液配制的有 4 个 50 孔梳齿的 2%（m/V）琼脂糖凝胶，浸入盛有足够覆盖凝胶表面的 1×TAE 缓冲液的电泳槽（附录 3G）。
2. 准备盛上样缓冲液的容器，使用 12 个一次性的微量混匀盘。
3. 调节 12 道的移液器以便执行下面的步骤：
装 2μl；
装 1μl；
装 2μl；
混合 5μl 体积 5 次；
除去 5μl。
4. 按 96 孔板 A1 至 A12 的顺序点 2μl PCR 产物。点 1μl 空气。点 2μl 的上样缓冲液。
5. 将吸头置于一次性的微量混匀盘的干净加样孔，用移液器混匀样品和上样缓冲液。
6. 将移液器置于一个 50 孔的排以使吸头含有从孔 A1 来的 PCR 产物加入第二排的孔中，接下来的每一个孔也照此步骤。
7. 重复此过程（每一次换吸头），从 PCR 板的 B 排第三个孔开始，与 A 排交叉，C 排从 26 孔开始，D 排从第 27 孔开始，与 C 排交叉。于孔 1～50 各加入 5μl 的 100bp 大小的标准品。
8. 重复此过程，上样以排 E、F、G 和 H 的顺序于第二个 50 孔的梳齿的凝胶中。上样按两个 96 孔 PCR 板一块胶，或者 16 个 PCR 板的单排样品。为了减少扩散和混合，每上完一批样提供 1min 的电压。
9. 提供电压开始电泳，让凝胶跑至溴酚蓝（快的条带）接近下一部分胶的胶孔的边缘。给凝胶拍照以便将来参考。看条带以完全一致的亮度分布在 600～2000bp 大小的范围内。将来对这些图像的计算机分析能够提供条带数目和大小的详细情况。

支持方案2 荧光光度法测定DNA浓度

材料（标√的条目参见附录1）

√Fluor缓冲液
96孔板的PCR产物
√TE缓冲液，pH8
√50μg/ml、100μg/ml、250μg/ml和500μg/ml的单链DNA标准品
用于荧光检测的96孔板（如Dynex）
12通道的多用移液器
荧光计（如PE Biosystems）
装有Microsoft Excel Software的计算机，因为荧光计没有自动分析功能

1. 标记一96孔板用于荧光检测。用一12通道的多用移液器加200μl的Fluor缓冲液于每一个孔。每个孔中的PCR产物取1μl从PCR孔板的一排加至荧光板的一排；按荧光板A至G排的顺序。
2. 在荧光板的最后一排，加1μl的TE缓冲液于第一和第七个孔，加1μl的系列单链DNA标准品（50μg/ml、100μg/ml、250μg/ml和500μg/ml）于剩下的孔中。
3. 准备一个拥有346nm激发光和460nm发射光的荧光计。必要时调整空白。如果荧光计不能支持自动分析，以Excel表格形式输出数据。
4. 以0～500μg/ml dsDNA检测标准化反应的线性度和产量。从样本和对照中减去空白值。以下列公式计算PCR反应中dsDNA的浓度：

   dsDNA（μg/ml）=PCR样本值/平均10μg/ml值×100。

支持方案3 用多聚赖氨酸包被玻片

材料（见附录1）

√清洗液
√左旋多聚赖氨酸溶液
金牌显微镜玻片（Becton-Dickenson ）
50slide不锈钢架子和50slide玻璃槽（Wheaton）
25slide塑料架和25slide塑料盒（Shandon Lipshaw）
不带纸或软木塞的塑料玻片盒（如PGC Sientific）

注意：当处理玻片时戴好无粉末的手套。如果接触到皮肤或是油脂的表面，要及时更换手套。用玻片清洗剂清理玻璃器皿和架子，该过程中必须使用超纯水。不能使用去垢剂。

1. 把金牌显微镜玻片插入50槽玻片架上，然后将架子放入盛有500ml清洗液的玻璃槽中。再将此槽置于平板摇床上以60r/min的速度振荡2h。
2. 将清洗液倒出，然后在水下冲洗玻片3min。重复4次。
3. 将玻片转入25槽塑料玻片架中，将其放入小的塑料盒中。将每个盒子中的玻片没入200ml左旋多聚赖氨酸溶液中，再于60r/min振荡1h。

4. 用水冲洗玻片 3 次，将其置于水中 1min。
5. 在 400*g* 离心 2min，干燥玻片盒以备存放。
6. 将玻片放回玻片盒中存放，并在其移置塑料玻片盒前直立过夜（不要用纸或软木塞）。于印迹前于室温下存放 2 周。

参考文献：DeRisi *et al.*，1997；lyer *et al.*，1999；Lockhart *et al.*，1996；Schena *et al.*，1995

编者：Yuan Jiang，John Lueders，Arthur Glatfelter，Chris Gooden，and Michael Bittner

单元 11.3　表达数据分析概述

表达数据的分析一般涉及两个部分：数据的标准化和数据的说明。本单元主要阐述后者，因为其技术特异性不高。

实验设计

实验设计过程中首要考虑的是实验要解决的问题。表达芯片试验的典型目标就是发现基因经不同的处理而导致表达的差异，或者是研究一系列基因经一系列不同方式的处理后表达的差异。由于以前基因表达水平未知，大多数的表达芯片主要比较不同处理样本和对照样本之间基因表达水平。

一旦处理组和对照组的实验条件确定，下一步就是规定处理样本的方式和规定如何分配这些处理方式。最简单的例子，mRNA 样本经实验组和对照组处理后，或者用单颜色芯片杂交或者用两种颜色的芯片杂交。更复杂的设计也是可行的，诸如颜色交换和 loop 设计（Kerr and Churchill，2001）。这样做得好处是增加了非生物因素的变异对照，如标记效率、染料作用、杂交差异和其他由测量过程中产生的错误等。

由于传统的统计技术依赖于复制数目的存在，设计阶段需要定好复制的数目和结构。复制结构因实验目的而定，复制数目可以用来估计究竟采用何种计算方式和优先采取某种计算能力。计算的目的就是为了检测因基因表达水平不同从而设计不同的复制数目。生物学和统计学的结合可以产生高效的数据，更好地解决目标问题。

标准化

基因表达数据来源很广，测量方法多样。测量方法通常采用随机单元，所以为了比较不同基因、样本、实验的差异必须采用标准化。标准化的目的通常是消除每个基因在每个样本或实验中的差异。通常可以采用特定设计的软件用自动化或手工的方式完成标准化过程。

单颜色芯片

最普通的转录数据类型来源于单样本、多基因芯片（如单颜色芯片）。这种每个基因每个芯片的典型测量方式，表明 mRNA 相对样本而言是过量的。有些程序也会附带一些相关信息，如背景信号以及数据点的大小和质量。这些信息可以评价这些数据的可

信性。

粗略的测量采用随机芯片，在区分时用处不大。一种方法是将转化更有用的相关表达信息，然后区分每个芯片和每个基因的作用。通过计算在一定背景下测量的 mRNA 的吸光度值计算每个芯片粗略曝光量。尽管能够提供有效的信息，所得数据取决于处理过程（如样本浓度或杂交时间）并且通常是生物学因素的。通常测量的信号越高，可信度就越大。一旦这个数字被确定，用原始数据除以该值所得的结果就是在测量中被调好的偏差，而这些偏差来自于单个芯片结果。

由于超基因效果，对于某一个给定基因 mRNA 的正常浓度能够通过观察大量给定基因样本的简单方法得以确定。那就是通过对每一个基因中间值（或平均值）的测定，确定为正常浓度，并且通过那个正常值区分所有的测量值。实际上，这种方法很好，特别是对于那些大量样本和实验。接下来重复而得到的数据库代表了单个控制条件，并且也能选择性地代表目前正常的浓度。

其他的数据转化和归一化可以在适当的地方使用。例如，阴性强度值能够被设定成零或者被隐蔽成为不可靠值，阴性控制基因能被用作背景强度的测量方法，阳性控制基因（管家基因）能被用做超芯片效果的估计，并且几个其他的程序能纠正由于测量过程产生误差的来源。在每个样本或实验中，超芯片效果和超基因效果的区分结果的数值，能够度量每个基因和正常值关联的水平。例如，在某种治疗下，它能够指出基因表达是正常的 1.4 倍。然后这些数值可以用做进一步的分析。

双色矩阵

在双色矩阵中每种基因有两种测量方法，能比较典型地指出杂交的对照和实验样本的不同，在同一个矩阵中利用不同颜色的染料标示出来。对信号和对照的荧光水平的测量的比率可以为与对照相关的样本中基因的相关表达提供一种测定方法。那些无维的比率然后能在芯片中比较，并且可以直接和上述的相关正常的浓度（单色矩阵）相比较。如果对照信号非常低，当它被误差所支配时，那些比率就可能是无意义的；因此系统分析专家应当忽视那些读数。

这仍然会有一些额外相似的信息（如背景会消减信号和控制，定量和定性的确实指示），那会被处理成和单色矩阵相同的方式。由于染料的不同或对不同颜色扫描的不同检出效率，关于每种染料的整体表达标准化是很有必要的，就像上面已经介绍的单种染料标准化的方法一样。

分析

区分不同表达的基因

一旦正常化和上述的基因表达数据库相似时，那结果的比率可以用标准的统计学技术来分析。尽管传统的技术集中在对不同的表达按一个标准做倍性变化，但是这种方法的局限性已经非常明显了。例如，倍性变化的途径使得固定倍性变化的假设和正在讨论的所有基因同等重要。然而，一个双倍性变化可能对某一个基因的真正生物治疗有预示作用，反之就在另一个基因，它可能在那个基因突变表达的自然发生范围之内，或者可

能是反映使用测量方法的固有的错误。由于这些原因，使用传统的 data-driven 统计学技术会比较好，它的显著的表达差异是基于在复制测量内的突变。那些方法大部分是依赖于复制测量方法对差异性和错误估计的存在。当复制无效时，就有能够用做估计错误的方法，描述如下。

当分析率来源于微阵列，那一般对于第一次适用的记录转化是个好消息。这是因为在基因表达水平的治疗效果一般相信是符合额外模型的，它的治疗效果会是倍增的。那记录转化在线性规模上会替代以前的数据，并且结果值会象征性的为零。区分不同表达的最直接的方法是在一个一个基因的基础上对记录率做一系列的 t 检验。对于双色数据库，当比率包含对照和实验的表达值时，单一样本的 t 检验就可以完成。例如，当对比两种以上的治疗方法时，在一组实验中，路径可以用方差分析（ANOVA）代替简单的 t 检验。对于每一个基因，在所有治疗条件中的方法同时进行比较，就会产生一个单一的 P 值。如果 P 值在阈值以下，那这个基因就被认为有不同的表达。更多高级的在整个实验中分析方差交错 ANOVA 模型将会被介绍。

微阵列实验典型地导致成千上万的基因表达的信息。当执行单变量的检验时，膨大的实验方法错误率和假阳性将变成需要地址的问题。在这种情况下，一般来说适合做一些复杂检验校正。一些控制失误发生率的方法，如 Benjamini-Hochberg 法，代表了一种合理的控制假阳性和假阴性方面的途径（Benjamini and Hochberg，1995）。

如果复制测试方法无效时，标准的统计方法对误差和标准差就没用了。它仍然有可能在这种情况下通过从许多不同的基因中混合集中残质的技术来估计误差。基因表达的差异性是正常表达水平的功能。它的量可以通过控制样本来测量，或者通过上述细节的标准操作来测量。由于它的独立性，错误信息的集中可以局部来做。另一种途径是通过误差稳定转化整个样本或实验。一旦这样做了，所有的基因都可以假定有相似的误差，因此所有对给定样本的测量方法都可以计算一个共同的误差（Duebin *et al.*，2002）。当只有很少的复制是有效的时，或需要更多对错误的可靠估计时，这种技术也是可用的。总之，真正的复制测量方法总是错误和误差信息的最好来源。

簇

簇是适用于集群基因概念的本属命名，通常依赖于表达谱。一般的概念是具有相似表达谱的基因可能有相似的功能或者拥有其他相似的性质。为了说明这些，表达谱的相似性定义就需要被确定了。

它的目的是为了定义两个基因产生一些表达模式的相似性的功能。有许多方法去完成它，其中最普通的是远距离方差和误差关联。最简单寻找相似基因的方法是对实验中的单个基因和其他基因进行表达模式的比较。这些找到的基因和我们感兴趣的基因有相似的表达谱。期望这些相似基因有某种关联。

大家的首要目的经常是寻找一组含有某种相似模式的特殊基因。若你不知道首先要寻找什么，则所有的基因可以依相似程度进行分组。有多种分簇算法，两种最常用的方法是 k 值法和“自组织作图法”。这两种算法中，需要的组数是粗略的，基因按表达情况被适当划分。这些算法都需要大量计算，基本是通过软件完成的。

另一组常用的表达数据分簇方法叫做分级数据分簇或树状分簇。当一株系统树完成

时，特征相似的器官往往相聚在一起。基因间的相似结构也能被用来构成一株“基因树”，这样，有相似表达特征的基因就分在一起。表达形式越接近，基因在这样的树上结合得越紧密。还可以用实验和样本来构成树，那些对基因影响效果接近的实验和样本会分在一起。这种方法比上述的几种方法有一个优势，即不必预先设定特异的组数，基因形成的组可以像树枝一样自动集成。

分类和预测类

基因表达数据的另一个潜在用途就是对肿瘤和其他组织进行分类。这些技术可用来找到癌症的预告基因，可以鉴定通过其他方法获得的组织的类别，还可以实现诊断目的。先前提到的分簇方法，用样本替代基因照样可行；当用于这些情况时，这些方法是无法监督的（如根据基因表达谱鉴定新的或者未知的组别）。可监督的是指把样本分入已知的组别。在这种设置中，一组已确定分类的组织样本（如恶性肿瘤）要用微阵列实验进行分析。基因表达分析结果则可用来对新样本分类或预测分类。

有很多统计方法和算法能用来进行分类预测。它们包括了多种判别分析、最接近法、树形分类和其他随着机器发展而产生的参数。在所有这些技术中，基本步骤是相似的。首先，根据已知分类中的样本的基因表达谱选定预测基因。这些基因的表达情况在各组间的差异很大，从而具备判别能力。然后，检测未知组中该基因的表达水平。结果用来将新的或是未知的样本进行分类。如果样本已经用另一种临床方法进行分类了，该结果就能作为一项确定依据。对尚未分类的样本，该结果还具有潜在的诊断意义。

序列分析

具有相似表达情况的基因可能被共有的转录因子调控。对于已经把基因组完全测序并绘图的器官，高通量计算能够在分簇基因（依据表达谱系的相似程度）的上游区域寻找到候选的DNA结合位点。可以在分簇的基因上游区域寻找任一推测的序列，或者可以在全部范围内寻找任意短序列（5～10bp），该短序列在分簇基因上游区域以异常高频出现。

通路分析和本质分析

一旦某些基因被确定是在不同条件下表达有差异的一种很好的候选基因，该结果应该在更广泛的范围内被解读，从分子生物的数据上升到更高层次的生物效应上。通过与先前比对的基因在功能、通路活动和细胞定位方面的比较，可以提供深入研究的资料。为此目的，Gene Ontology（GO）建立了依据生物学过程、细胞内定位或分子过程的分级分类组，有确定的组名。进而，该研究小组开始着手将基因归入已有的分类中。现在，研究者可以到NCBI的LocusLink搜索基因的分类信息或根据GO的数据进行高效的分类。几个在线通路数据库也致力于此，尤其是KEGG（京都基因及基因组百科全书）、Biocarta和GenMAPP。最终，通过观察各基因小组之前的重叠，利用统计学手段分析其联系的方法也将用来检测潜在的联系。

信息学和数据库

当在做很多实验时，尤其是在一个大的组织内，一个实验室信息管理系统（LIMS）数据库对了解谁在何时、在哪个实验上做了什么，是很有帮助的。这种数据库一般是客户订制的，符合相应的实验室流程，但有的公司提供预制的数据库。在一个高通量工作环境下，LIMS数据库能帮助跟踪一个样本，从它刚被制成或分离出来开始，到微阵列杂交中的数据收集。通常这些数据对于质量控制很有用（如跟踪鉴定污染的试剂）。这些管理系统通常直接和微阵列的扫描仪相连，这样，样本注释、数据收集和随后的数据分析可直接在一个平台上操控。

数据存档

任何微阵列数据库，实际结果存档时都必须和该次实验的各项参数联系起来（如各实验之间的不同）。另外，有必要将统计分析的数据存档（如各特异实验间参数变动中的基因的不同情况）。为此，有两种常用技术。

文档（text）。数据可以通过图形处理软件转化为文档进行存档。对于独立研究者，这种方法很便宜，也很方便；但这常给组间合作制造麻烦，而且造成历史数据丢失。以文档方式储存也缺少LIMS特性，而不能提供该次实验的具体描述。有的实验室用flat-file形式存档，这样通过一些文档管理系统（如Pharmatrix Base4）或者flatfile储存工具（像Silicon Genetics的GeNet）可以有所促进。

SQL。数据可以用SQL（Strctured Query Language）语言数据库存档，这样和LIMS关联，更便于跟踪样本。很多不同的工具能从数据库中压缩数据。这种方法可能比较慢，也比较贵，但是有备份，而且更可靠。Affymetrix的AADM数据库就是这样的，而且它和Affymetrix的LIMS相关联。当实验参数储存在这种数据库中，可通过一系列的数据分析包自动重新得到它们。这种数据库的功能性不强，但是适于储存统计数据。一个企业级的表达数据库，像GeNet，既能储存原始的表达数据，也能运算统计分析的结果，而且是在一个数据包里。

使数据全球公开化

FTP。原始数据可以通过FTP服务器传递。这种方式对实验者来讲很简单，但是对其他人来讲又很麻烦，因为这需要对数据结构的细节描述来使数据更可用。

公共数据库。NCBI和EBI已经创立了类似的数据库。这些形式使得在互联网上的每个人都能得到数据，也对研究者更有帮助。另外，GeNet也给用户提供在线数据库，并且是在个人防火墙外的，这样用户就能通过浏览器浏览可选的数据。

编者：Anoop Grewal，Peter Lambert，and Jordan Stockton

第 12 章　基因治疗载体

在基因转移方法的发展过程中有几点关键因素，主要包括：载体的种类与设计；转染的方法；靶器官系统；生物学终点。越来越多的新的基因转移方法被创造出来并被评估。病毒载体（反转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、疱疹病毒载体）是目前把基因转移到细胞中应用的最多的载体。随着对病毒载体安全性关注的升级，优化非病毒载体（裸 DNA、DNA-脂质体复合物、微粒结合 DNA 转移的基因枪技术）研究方面的力度也大大增加。在非病毒载体研究方面的进展成功地在基因治疗的某些方面提供了一种比病毒载体更安全的替代品。

在体细胞基因转移方面目前正在应用的有：RNA 病毒载体（反转录病毒载体）、DNA 病毒载体（腺病毒载体、腺相关病毒载体、疱疹病毒载体）、裸 DNA 载体和 DNA 复合物。每种载体系统都有自己的优点和缺点，因而影响它在特定组织和器官中的应用。但是没有一种载体系统是完全令人满意的，没有一种载体能够适用于所有的基因治疗方法。有关病毒学、细胞生物学和免疫学的研究正在开展，希望以此来阐明载体在体细胞内的行为和命运。

首先，必须强调的是在构建和操作病毒载体过程中安全的重要性，因此在本章的开头（单元 12.1）我们就生物安全性的一般注意事项做了介绍。我们希望通过本单元的内容帮助正在考虑使用基因转移载体的读者们对生物安全性的问题有个大概的了解。当然，书中的内容是不够详细的，感兴趣的读者可以查阅书后列举的参考文献，网络资源，还有就是咨询当地学术机构的专家的意见。读者同样必须考虑到基因表达产物的性质也存在着潜在的安全性问题。例如，带有生长因子和血管生成因子基因的载体，如果具有感染人体细胞的能力的话，那么它将具有很大的生物危害风险。能够调节转基因片段在多种组织而非特定组织表达的病毒源性启动子的广泛使用导致了另外一个有关安全性的问题。基因的异位表达和全身性病毒载体的散布对人体的影响应该成为载体安全性评估的一个部分。虽然生物安全学术委员会有权批准基因转移载体的构建和使用，但最终能够对生物安全性负责的还是研究者本人，因为他最有可能知道自己实验涉及的生物系统的安全性问题。

单元 12.2 对构建腺病毒载体的方法做了说明。因为腺病毒能够有效地感染许多哺乳动物细胞，所以腺病毒载体成了基因转移和基因治疗研究方面的热点。有关腺病毒载体的应用前景和缺陷该单元也做了介绍。

单元 12.3 对有关最新的腺相关病毒载体（AAV）的构建方法做了说明。野生型的腺相关病毒在人体中并不存在，在某些系统中，腺相关病毒可以整合到被感染细胞的基因组中从而使得转基因在生物体内长期表达。但是，怎样获得高浓度的辅助载体和病毒载体相独立的腺相关病毒载体一直以来是个难题。Samulski 和他的同事们提出的一种基于质粒的体系为解决这一难题迈出了重要的一步。

在单元 12.4 中我们将介绍最早应用于人类基因治疗研究的病毒载体——反转录病

毒载体。反转录病毒载体是载体系统中生物学性质最为人熟知的，而且目前它们仍旧在载体领域占有重要的地位。反转录病毒载体可被修饰成带有疱疹性口炎病毒糖蛋白外壳的类反转录病毒颗粒。类反转录病毒颗粒相比野生型的反转录病毒而言更容易获得较高的浓度。单元 12.5 将讨论类反转录病毒载体。单元 12.6 将介绍高浓度的慢病毒载体的原理。单元 12.7 将介绍复制缺陷型的单纯疱疹病毒载体的构建原理。单元 12.8 将介绍用无病毒源性的 HSV-1 辅助扩增子来进行基因呈递的原理。

用来提高基因转染效率的非病毒载体方法包括：使用 DNA-脂质体复合物，颗粒介导 DNA 呈递等。单元 12.9 将介绍脂转的原理。

编者：Anthony Rosenzweig and Elizabeth G. Nabel

单元 12.1　基因转移载体的生物安全性问题

在具备 BL2 级别的实验室操作

建造一所具有 BL2 级别的实验室是比较容易的，可以参照 CDC/NIH 提供的生物学安全操作手册或者那些由 NIH 官方研究服务机构提供的标准来建造。标准的 BL2 实验室有水槽、洗眼装置、淋浴设备，容易擦洗的实验台、地板、天花板，没有利于隐藏有害生物的拐角或者裂缝，有排气扇、无菌操作台，有可以利用的高压灭菌装置，有处理实验废弃物的方法和当处理高活性的 RG2 生物时要紧关大门（标记有生物危害）。

困难的是制定 BL2 实验室的规章制度并且确保大家都落实执行。关于这点以下四个方面至关重要：实验室主任（PI）的素质和行为，员工的培训情况，个人保护装置的使用和操作方法特别是无菌操作台的使用。

主任

实验室运行的方方面面都掌握在实验室主管的手中，因此主任必须经常到实验室安排具体某个人负责实验室每天的安全问题（实验室安全员，如实验室主管），确保实验室安全员受过良好的仪器安全操作方面和治安管理方面的培训，建立一套对新老员工的培训机制，确保员工不要工作到精疲力竭，不让与实验室无关的人员进入实验室，制定定期的仪器设备维护机制，建立一套更新过时和破损仪器的体系。经验证明，一个实验室如果有个好的主任，那么这个实验室往往比较安全和高产。

员工培训

当实验室新来的员工们开始工作的时候，一位资深的员工必须被指派去教他们实验中遇到的危险物品的处理方法，将要使用的仪器的工作原理，遇到诸如危险物品溅出或者爆炸等情况怎样处理以及怎样使用保护设备和衣服。老员工们也必须时不时的接受这类教育，特别是当教育内容有新的变化的时候。

员工们必须能够得到有关安全方面教育补充说明的书面材料，他们必须知道当他们需要这些材料的时候在哪里可以得到以及怎样才能使他们额外的问题得到解决。最好是

制定一个实验室生物安全手册，其中包括实验室所用实验技术的操作方法和有关处理危险物品方法的总结。操作手册应该包括标准的实验操作流程，紧急事故处理方法，求救电话号码，有关在实验室工作对身体危害的讨论以及介绍实验室可供员工使用的安全防护设备及服装。有关生物安全行指导的样本可以在下面网址中找到：

http://biosafty.bwh.harvard.edu/BWH_Biosafety_Manuals.htm.

http://www.ovpr.uga.edu/qau/qcg.html#top.

无菌操作台

许多人认为空气层流组织培养罩能够保护他们的培养物免受污染。他们都错了，其实，几乎没有任何设备能够使得培养物完全免受污染。空气层流组织培养罩具有两种功能：保护实验者和保护实验对象。使用无菌操作台的人几乎很少有知道它们的工作原理的。使用者应该知道无菌罩是通过在操作台前制造空气幕来起防菌作用的。空气幕阻止了罩内外空气的对流。任何干扰空气幕的行为都将影响无菌罩功能的正常发挥。伸出一只手穿过空气幕会引起短暂的气流混乱。无菌罩内的火焰能够产生强的气体对流而破坏空气幕。盖上通风栏将阻止空气幕的产生。

即使是很小心地操作也不能避免飞溅和溢出事件的发生。这就意味着唯一能够避免液体飞溅的是无菌台的玻璃窗。椅子的位置应该调节好，以至于玻璃窗的底部刚好处于实验者腋窝的位置。这有助于保护实验者的脸部，同时使实验者操作更方便。

保护设备和服装

手套。只有当手套完好无损时才具有保护研究者的作用。随着使用时间的延长和使用次数的增多，手套会变质。持续的扩张和收缩会使手套上的小孔变大。许多液体，包括洗手液、酸液、碱液和一些有机溶剂能够缓慢降解手套（乳胶的，或者人造的）。经常换手套和经常洗手应该成为研究者的习惯。戴两副手套操作既笨拙又不舒服而且完全没有必要。

除非手套是无菌的，否则它们必须被考虑到是污染的来源之一。实际上，用树浆做的非无菌乳胶手套上包含（并且释放）许多有活力的、外源性的孢子以及有活性的核酸酶和蛋白酶。

在过去的十几年里，实验室和诊所工作人员因为使用乳胶手套而导致的过敏症的事情明显增多。无粉、低乳胶、低蛋白含量手套的广泛使用降低了产生这类问题的风险。但是，手套制造业中的一个恼人的事实是，乳胶中的水溶性变应原容易聚集在手套内面而且可以被汗湿的手吸收——另外一个要经常换手套，经常洗手的原因。

眼睛防护设备。如果在无菌操作台外面操作挥发性高的培养物时，研究者应该戴上脸部防护护具、口罩或者是合适的护目镜。在进行有可能产生悬浮微粒的操作时，这点尤其重要。眼睛是具有感染性的物质感染人体的常用通道之一。

面罩。外科手术面罩是用来保护患者免受外科医生（可能感冒，抽鼻涕）感染的而不是用来保护外科医生免受患者感染的。外科手术面罩能够阻止大的唾液通过，但不包括小的唾沫。对绝大多数实验工作来说，面罩除了能够防止被污染的手指伸到自己的鼻子或者口中去之外没有什么其他的保护作用！如果担心在实验过程中唾沫的产生，由

NIH 生物安全部门推荐并提供的一次性的、通常是 N95 级的面罩能够胜任这项工作。

尖锐物的处理。在实验室中许多被感染的例子都是通过尖锐物引起的。如果实验过程中要使用注射器（如用动物做毒性实验），用带鞘的注射器，并且在丢弃时不要把针头从注射器上取下来，要把注射器连同针头一起丢弃到一个专门用来处理尖锐物品的容器中。手术刀、剃刀、刀片等类似的物品都应该放在一个专门用来处理尖锐物品的容器中。当容器满了的时候，整个容器应该密封起来当作医疗废弃物相应处置。

实验室着装。在 BL2 实验室必须穿专用的外套。当离开的时候研究人员必须换下外套。外套宽大的袖口容易拌住瓶子。最好的（最贵的）实验室外套自带有松紧带来扎紧衣服的口子。这不但能够避免拌住瓶子而且能够尽量减少身体的暴露部分。实验中如果衣服弄湿了，应该马上换干衣服。当衣服被培养物污染时要高压灭菌清洗。

操作

消毒。高压灭菌是杀死感染微生物的最有效的方法。当然，有些简单的灭菌方法效果也不错。在进行人类基因转移载体研究工作的实验室中，用煮沸的方法消毒也是一种不错的选择。平常洗衣用的洗衣粉（次氯酸钠）和盥洗室用的清洗剂都是非常好的消毒剂。

悬浮微粒。悬浮微粒是肉眼不可见的非常微小（1μm 左右）的悬浮小液体颗粒。因为肺是比较容易感染的部位，当研究者不小心吸入了悬浮微粒时可能得病。这里有几种感染途径。剧烈振荡病毒悬液会产生大量的病毒悬浮微粒。当对人体有害的液体振荡后应该在无菌操作台内打开盖子。旋开离心管盖子的过程也可以产生悬浮微粒。如果是螺旋瓶盖的话，旋开的时候就不会遇到这种问题。

当离心管在离心的过程中在离心机里面破裂的时候，研究者可能遇到最大量的悬浮颗粒。离心管中漏出来的液体在离心机的作用下被打碎成非常细小的悬浮颗粒。当离心机的盖子被打开的时候，人们往往看不到明显的悬浮颗粒。为了防止悬浮颗粒的产生，操作人员应该使用带有透明塑料盖子的离心转子。离心时，当有离心管破裂的时候，操作人员可以把整个盖着盖子的转子拿去消毒。即使在封闭、固定的转子中离心，离心管有时也会破裂（特别是当转子不干净的时候）。当离心管中的物质有毒时，整个转子应该搬到无菌操作台去打开。

溢出物。在无菌操作台之外产生的溢出物常常产生大量的悬浮颗粒。如果其中包含转基因载体或者是对人体有害的物质，最好让大家都离开实验室直至悬浮颗粒沉降下来（最少 30min），并且寻求专家的帮助。当再次进入实验室的时候最好戴上一次性的 N95 级的口罩。当清理溢出物的时候，操作人员要戴上厚厚的手套，带一次性的刷子、钳子、垃圾桶还有吸水的毛巾。最好在使用这套东西前就配备好，并且放到大家都容易拿到的地方。大量的溢出物可能需要大家一起清理。在清理过程中，操作者应该尽量避免皮肤接触，操作小心，避免导致新的悬浮颗粒的产生。

休息。对于研究者来说保证充足的休息并不是奢侈的，而是必要的。即使是聪明的人在他精疲力竭的时候也会犯愚蠢的错误。任何人连续工作 14 个小时无论对于他自己来说还是对于别人来说都是危险的。对于实验室的其他人来说如果看到自己的同事很疲惫，睡眠不足的话，有必要劝他回去好好休息再来工作。

动物实验安全级别 2（BL2）

如果要做动物实验的话，有关动物实验 BL2 实验室的硬件要求与前面描述的基本相同。一个不同之处是，养动物的笼子在洗之前要灭菌，最好是高压灭菌。笼子垫和其他废物在丢弃之前也要经过灭菌。这些将大大增加饲养动物的成本。许多生物安全委员会都提倡在做动物实验时坚持 BL2 的规定和操作步骤。NIH/CDC 关于怎样在饲养动物过程中处理危险有害物品的建议可以在微生物和生物医学实验室中的安全问题的第四部分中找到，其网址是：http://www. cdc. gov/od/ohs/biosfty/bmbl/section4. htm.

特殊的载体

NIH 下属专门针对重组 DNA 研究设置的部门记录了所有由 NIH 资助的研究机构所采用的基因转移方法。有关最新的记录可以在这个部门的主页（http://www4. od. nih. gov/oba/RAC/PROTOCOL. pdf）上找到。

关于载体特点和安全性问题的进一步讨论可以在 CPHG 表格 12. 1. 2 中找到。

网络资源

http://www. bmbl. od. nih. gov/conyents. htm

http://www. fda. gov/cber/index. html

http://www4. od. nih. gov/oba

http://www4. od. nih. gov/oba/rac/guidelines. 02/APPENDIX _ B. htm

http://www4. od. nih. gov//oba/rac/guidelines _ 02/APPENDIX _ M. htm

http://www. biosafety. bwh. harvard. edu

参考文献：Fleming *et al*. ,1995;Flint *et al*. ,1999;National Research Council,1989

编者：Andrew Braun

单元 12. 2　腺病毒载体

如图 12. 2. 1 所示，腺病毒（AdEasy）体系的简单构建主要有三步。一般说来，转染 7～10d 后就可以看到构建好的腺病毒。改造了的（AdEasier）构建方法更简单，更高效（图 12. 2. 2）。

研究人员可以免费获得 AdEasy 体系。想要了解更详细的信息请访问 AdEasy 的主页（http://www. coloncancer. org/adeasy. htm）。

根据美国国家健康研究所基于风险评估所制定的生物安全指标，人类腺病毒操作应在经使用者公共机构生物安全委员会审定为生物安全二级的实验室内进行。此类实验室要求使用分层气流罩，并建立净化和处理固液体废物，以及对被污染表面和设备消毒的合理程序。见单元 12. 1。

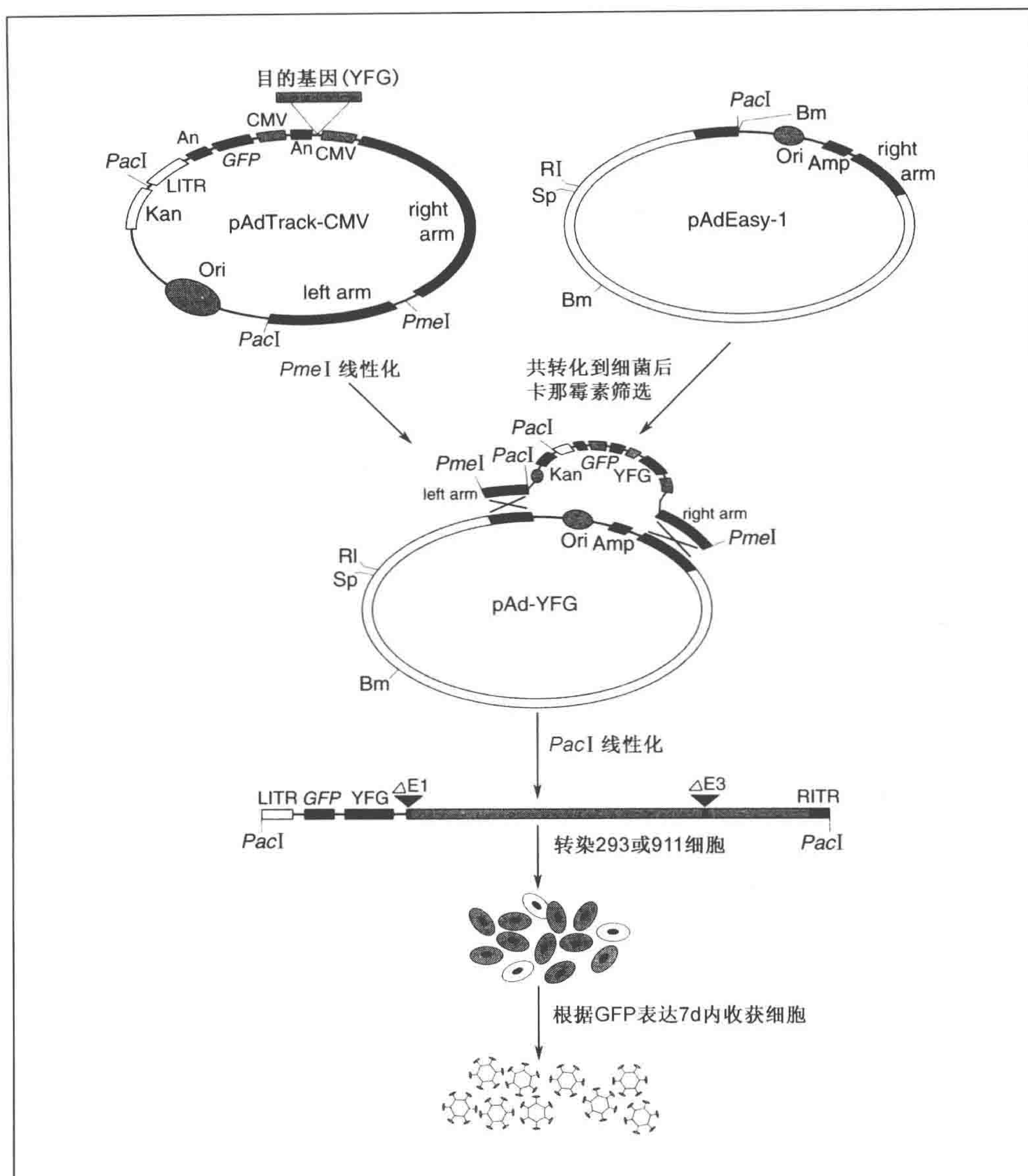


图 12.2.1　AdEasy 的原理介绍。目的基因首先克隆到一个穿梭质粒上（如 pAdTrack-CMV）。合成的质粒经限制酶 *Pme I* 消化后线性化，接着和一个腺病毒骨架质粒（如 pAdEasy-1）一起转化到大肠杆菌 BJ5183 细胞中，重组体经卡那霉素筛选后酶切鉴定。最后，线性化的重组质粒转染进腺病毒包装细胞系中（如 293 细胞）。重组的腺病毒在 7～12d 内出现。"左臂"和"右臂"代表了穿梭质粒和腺病毒骨架质粒的同源重组区域。缩写：An，多腺苷酸化位点；Bm，*Bam*H Ⅰ；RI，*Eco*R Ⅰ；LITR，左侧插入末端重复（ITR）和包装信号；RITR，右侧 ITR；Sp，*Spe* Ⅰ。经同意后根据文献 He 等（1998）重新构建。版权（1998）属于美国国家科学院。

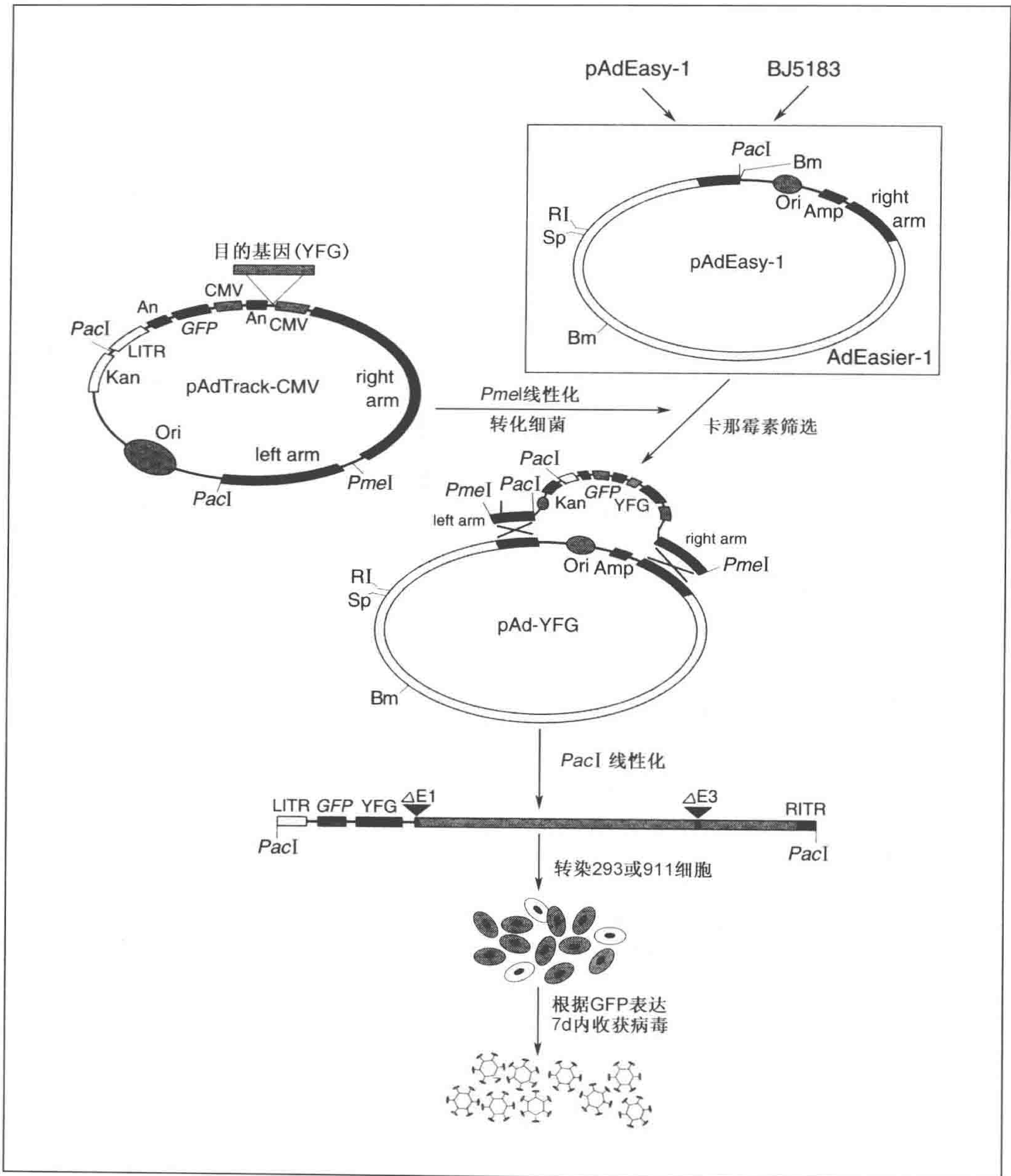


图 12.2.2 AdEasy修饰技术示意图。这一修改后的方法牵涉到使用AdEasier细胞，此细胞是BJ5183的衍生细胞，为了提高腺病毒质粒重组的效率，该衍生细胞内包含了pAdEasy质粒骨架(pAdEasy-1所示)。而此方法剩下部分的内容实际上与图12.2.1所描述的标准AdEasy系统相同。改编于He等(1998)。版权(1998)属于美国国家科学院。

策略安排

载体的选择

AdEasy 系统提供了四种不同的穿梭载体。如图 12.2.3 所示，pShuttle 载体是最基本的穿梭载体，其容纳外源基因的能力最大，并适于装载转基因表达所需的启动子。

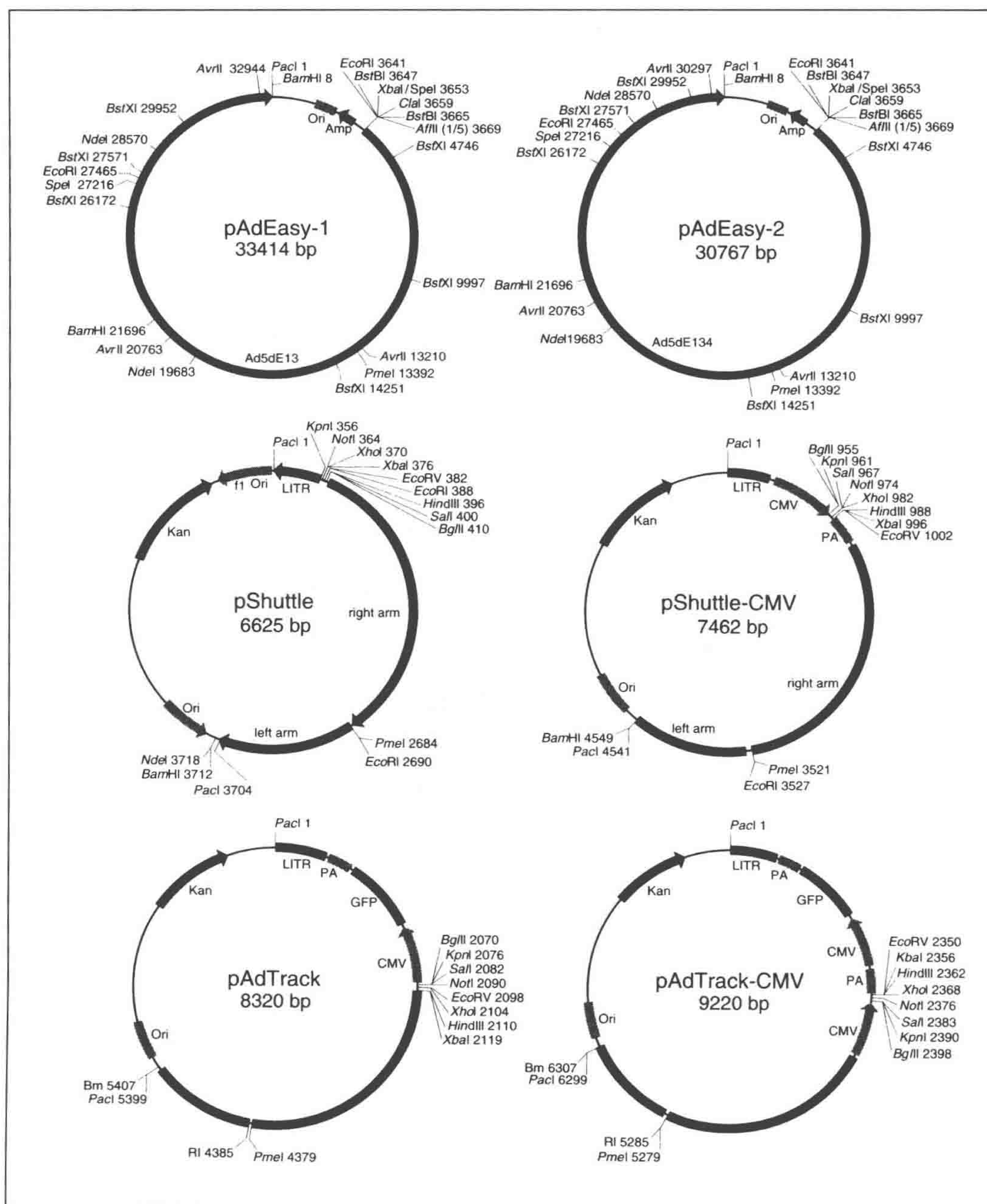


图 12.2.3　穿梭载体和腺病毒骨架质粒在 AdEasy 技术中的运用。缩写定义见图 12.2.1 说明。翻印于 He 等（1998）。版权（1998）属于美国国家科学院。

不同载体间的特征和应用已列于表 12.2.1 中，用以帮助研究人员选择合适的载体组合。表 12.2.2 列出了使用 AdEasy 技术过程中可能产生的潜在问题以及导致问题的可能原因和解决方法。

表 12.2.1　AdEasy 载体的选择

穿梭质粒	腺病毒骨架	包装细胞	最大插入片段大小	GFP 示踪	应用
pAdTrack-CMV	pAdEasy-1	293or911	5.0kb	是	CMV 启动子启动所选基因的表达，且伴 GFP 示踪
pAdTrack-CMV	pAdEasy-2	911-E4	7.7kb	是	CMV 启动子启动所选基因的表达，且伴 GFP 示踪
pAdTrack	pAdEasy-1	293or911	5.9kb	是	最感兴趣的启动子启动所选基因的表达，且伴 GFP 示踪
pAdTrack	pAdEasy-2	911-E4	8.6kb	是	所选启动子启动最感兴趣的基因表达，且伴 GFP 示踪
pShuttle-CMV	pAdEasy-1	293or911	6.6kb	否	无 GFP 示踪情况下的基因表达
pShuttle-CMV	pAdEasy-2	911-E4	9.1kb	否	无 GFP 示踪情况下的基因表达
pShuttle	pAdEasy-1	293or911	7.5kb	否	无 GFP 示踪情况下，大量或者复合基因表达
pShuttle	pAdEasy-2	911-E4	10.2kb	否	无 GFP 示踪情况下，大量或者复合基因表达

表 12.2.2　使用 AdEasy 技术过程中的相关问题指导

潜在问题	可能原因	解决方法
共转化 BJ5183 后，克隆数少甚至无	转化条件不佳	按照本单元提供的方案操作
		向制造商咨询电转设备的详细说明
	使用了错误的抗生素，或者抗生素的浓度过高	将转化产物铺在含 25μg/ml 卡那霉素的固体培养基皿上
	使用了错误的菌株，或者 BJ5183 被污染	将 BJ5183 用于同源重组
		培养 BJ5183 细胞时加入一定比例的链霉素以消除可能引起污染的菌群
	DNA 制备不佳	用氯化铯梯度法提纯 AdEasy 骨架质粒
		避免从胶中纯化用 *Pme* Ⅰ 酶切消化了的穿梭载体
		按照碱裂解小量制备 DNA 的程序来提取质粒；避免使用商业试剂盒
	BJ5183 感受态转化能力偏低	保持一定的 BJ5183 细胞浓度
		检测 BJ5183 细胞的感受态

续表

潜在问题	可能原因	解决方法
		仔细根据支持方案 3 提供的步骤制备高质量的 BJ5183 感受态细胞原种
		避免反复地冻融感受态细胞
		购买商业性质的 BJ5183 感受态细胞
		转入 AdEasy 质粒至 BJ5183 再用其制备 BJ5183/AdEasy 感受态细胞(注意事项见正文)
共转化 BJ5183 后，克隆数过多	用于转化的穿梭质粒 DNA 过多	减少穿梭质粒的使用量(通常 0.1～0.2μg 即可满足)
	Pme Ⅰ 酶切消化不完全	检测琼脂糖凝胶中的酶切产物
		减少酶切的 DNA 量
		确保酶的活性
	转化后培养的时间过长	将培养时间降至最短，一般 37℃ 下不超过 30min(大多数情况下，电转后无需培养)
转染 293 细胞后未发现病毒噬斑	质粒 DNA 制备不当	按照氯化铯梯度程序制备 DNA
	293 细胞传代次数过多	使用早期传代细胞或者初始的 293 原种细胞
	重组的质粒并没有被 *Pac* Ⅰ 线性化	用 *Pac* Ⅰ 酶切消化病毒质粒
	转染效率过低	通过优化条件或者使用不同类型的转染试剂提高转染效率
	培养时间不够	培养更长时间，如≤2 星期(对于转染效率低的情况，这一点尤其重要)
	腺病毒骨架存在缺陷	通过对照载体，对重组质粒进行广泛的限制酶酶切分析
	插入片段超出腺病毒的包装范围	根据表 12.4.1 选择合适的 AdEasy 载体
检测不到转基因表达	转基因未能整合	通过限制酶酶切分析和 PCR 确保转基因盒完整
	瞬时转染效率不够高	通过优化条件或者使用不同类型的转染试剂提高转染效率
		通过阳性对照，确保检测系统工作正常
	转基因未能有效表达	确保编码序列前包含一段冈崎片段

将感兴趣的基因克隆到穿梭载体中

如若实验者所感兴趣的基因与穿梭载体没有准确配置的限制酶酶切位点，就必须通过 T4 DNA 聚合酶将一方或双方的限制性酶切位点平末端化。有些情况下，可能通过连接酶或 PCR 扩增的方法来导入新的限制性酶切位点更为方便。而 PCR 的方法显得快捷而有效，但其扩增的基因必须通过测序证实。

如果选择 pShuttle 或者 pAdTrack 载体，使用者必须提供一个启动子和多腺苷酸化信号来作用于转基因表达盒。对于所有的穿梭载体而言，在编码序列之前包含一段保守的冈崎片段尤为关键。

由于设计的 *Pme* Ⅰ 和 *Pac* Ⅰ 两个酶切位点将用于线性化那些转化和转染后的最终质

粒结构，所以应避免在此些位点处插入外源片段。当然，如果不可避免，这些质粒仍然可以使用，只不过更具难度。可通过 *EcoR* Ⅰ 和 recA 辅助限制性内切核酸酶不完全酶切消化或者定点诱变来消除感兴趣的限制酶酶切位点来达到使用目的。

如果想要得到复合基因表达盒，那么避免以头头方向克隆相同的元件（如 CMV 启动子）就至关重要。如若发生同源重组则有可能导致两元件间序列丢失。但是这种不必要的重组可以通过安插头尾方向的重复元件来避免。

注：除特殊处理，所有细胞都置于 37℃，5% CO_2浓度，增湿型培养箱中培养。

注：所有与细胞培养相关的溶液、试剂和设备都必须严格无菌，并且正确运用如前所述的无菌操作技术。具有生物公害的废弃物包括腺病毒在内应使用氯漂白剂消毒。

基本方案　运用 AdEasy 方法产生重组腺病毒载体

转染后应连续观察病毒产物 7～10d。

注：如果如前所述运用 AdEasier 细胞来产生重组，则省略第 6～10 步（备选方案）。

材料（标√的条目参见附录 1）

感兴趣的基因
√具有卡那霉素抗性的 LB 培养基
限制性内切核酸酶（AdEasy，具体为 *Pac* Ⅰ、*Pme* Ⅰ 或 *Eco*R Ⅰ）
穿梭载体 DNA（Quantum Biotechnologies 或 Stratagene）
√7.5mol/L 乙酸铵
seeDNA（Amersham Bioscience）
20mg/ml 糖原（Roche Molecular）
√25∶24∶1（*V/V/V*）苯酚/氯仿/异戊醇
70%和 100%乙醇
电促感受态 BJ5183 细胞（支持方案 3，或 Quantum Biotechnologies 或 Stratagene）
pAdEasy-1 超螺旋腺病毒骨架载体（Quantum Biotechnologies 或 Stratagene），需经氯化铯纯化
√铺有卡那霉素抗性的 LB 固体培养基皿
0.8%（*m/V*）琼脂糖凝胶
感受态 DH10B 细胞或其他不易发生重组的细胞
293 细胞（E1-转化的人类胚肾细胞）
脂质转染 AMINE 试剂（Life Technologies）
Opti-MEM Ⅰ 培养基（Life Technologies）
达尔伯克（氏）改良伊格尔（氏）培养基（DMEM；Life Technologies）
完全 DMEM：即加入了 10%PBS，1%青霉素或链霉素的 DMEM
HBSS 或灭菌的 PBS（Life Technologies）
15ml 锥形管

37℃定轨摇床

2mm 电转杯，保持冰冷

Bio-Rad 基因脉冲电转仪（或相似仪器）

37℃细菌培养箱

25cm^{2}组织培养瓶

37℃，5% CO_2 培养箱

细胞刮（橡胶警察）

50ml 锥形离心管

干冰/甲醇浴箱

向所选的穿梭载体进行所感兴趣基因克隆时，须考虑到如前所述的一系列问题（策略安排）。在开始腺病毒的建构之前，通过瞬时转染的测定方法来证实穿梭载体中转基因的表达是个很好的实验习惯。最终重组腺病毒质粒中转基因的整合也应利用特征性的限制性内切核酸酶酶切消化或 PCR 扩增来分析。

1. 挑取可能含有感兴趣基因的候选克隆，接种于 2ml 具卡那霉素抗性的液体培养基内，由 15ml 锥形管装载。置于 37℃定轨摇床上扩大培养过夜。
2. 使用任意标准的碱裂解法提取纯化质粒 DNA。通过限制性内切核酸酶酶切分析和（或）PCR 扩增证实转基因的存在和方向。

   除 pAdEasy-1 和-2 是氨苄青霉素抗性以外，其余所有的穿梭载体和重组腺病毒质粒都为卡那霉素抗性。

3. 利用 *Pme* Ⅰ或 *EcoR* Ⅰ限制酶酶切，线性化已证实的穿梭载体。为保证完全酶切，建立 100μl（0.1～0.5μg DNA）反应体系并加入 5μl 的酶，以使本底降至最小化，并经琼脂糖凝胶证实是否酶切完全。
4. 往 100μl 酶切反应后的体系中，加入 100μl 双蒸水，100μl 7.5mol/L 乙酸铵以及 2μl seeDNA（或以 2μl 20mg/ml 糖原代替）。再加入 300μl 25∶24∶1（*V/V/V*）苯酚/氯仿/异戊醇，pH8.0（附录 3B），提取 DNA。
5. 转移 DNA 溶液上层至一干净离心管内。再加入 600μl 100%乙醇，16 000*g*，室温，离心 5min。再加入 70%乙醇清洗沉淀两次以消除残留的盐。8μl 双蒸水重悬 DNA。
6. 准备电促感受态 BJ5183 细胞，等分成 20μl/管，保存于－80℃（支持方案 3）。准备转化时，将其解冻并置于冰上。
7. 往 20μl 的感受态细胞内加入 8.0μl 的经 *Pme* Ⅰ酶切后的穿梭载体（来自第 5 步）以及 1.0μl 的 pAdEasy-1 超螺旋腺病毒骨架载体（100ng/μl）。最终体积限于≤30μl。
8. 小心转移细菌/DNA 的混合物至冰冷的 2mm 电转杯内，避免产生气泡。并保持电转杯置于冰水中。将 Bio-Rad 基因脉冲电转仪调至 2500V，200Ω，25μFD，并递呈脉冲。
9. 将转化的混合物重悬于 500μl LB 培养基中。铺于 3 或 4 个 LB/卡那皿，37℃培养过夜。

   在铺皿前，转化的细胞可先于 37℃静止培育 10～20min。

10. 挑取 10～20 个最小的单克隆，接种于 2ml 含 25μg/ml 卡那霉素的液体培养基内，置 37℃摇床上扩大培养 10～15h。

为了更有效地获得重组腺病毒质粒，使用者可尝试列于本节最后部分的备选方案（备选方案）。

11. 使用任意传统的碱裂解法小量制备质粒 DNA。并取各产物的 1/5 进行 0.8％的琼脂糖凝胶（参见附录 3G）电泳，以检测超螺旋质粒的大小。可能性的重组产物与 12kb 的条带相比，大约慢 1kb 的电泳梯度。
12. 用 *Pac* Ⅰ酶切消化待测候选克隆质粒。正确的重组产物通常酶切出一条大片段（约 30kb）和一条 3.0kb 或 4.5kb 大小的小片段。
13. 再将 1μl 正确的重组质粒转化至 DH10B（或其他质粒复制时不易发生重组的菌株）。进一步对克隆进行限制性内切核酸酶酶切分析以确证它们的初始结构。最后，通过氯化铯结合法或使用商业提纯质粒的试剂盒提纯质粒，以备转染 293 细胞。

如果本底过高，可考虑以下的修饰方法。①在电转后，不必再培育细菌的混合物，而是直接铺皿；②尝试减少用于 *Pme* Ⅰ酶切消化的穿梭质粒 DNA 量；③尽量使穿梭质粒产生缺口的可能性降至最低（如使用碱裂解法制备提取穿梭质粒）。

由于在 BJ5183 细胞内，质粒发生重组和重排的频率较高，故实验者就不应再使用 BJ5183 细胞来培养候选的重组克隆，而应从 BJ5183 细胞内尽早地回收潜在的重组质粒，且一旦确证，则应再将质粒转化至 DH10B 或其他普通的菌株内，以供质粒复制。

14. 转染之前 12～20h，将 293 细胞以 2×10^6 个细胞/瓶的密度铺于 1 个或 2 个 $25cm^2$ 组织培养瓶中。（在转染之时，细胞融合度应达到 50％～70％）。
15. 转染当天，用 *Pac* Ⅰ酶切消化重组腺病毒质粒（大约 4μg DNA/瓶）。建立 100μl 酶切反应体系以确保酶切完全。用乙醇离心沉淀酶切消化后的质粒，加入 20μl 灭菌水重悬质粒。
16. 根据制造商的手册，进行标准脂质体转染。将 4μg 经 *Pac* Ⅰ酶切消化的质粒和 20μl 脂质转染 AMINE 试剂混合加入至已装有 500μl Opti-MEM Ⅰ 培养基的 $25cm^2$ 组织培养瓶中。将 DNA/脂质转染 AMINE 试剂混合液室温静置 15～30min。
17. 当混合液静置之时，去除铺有 293 细胞的 $25cm^2$ 组织培养瓶内的培养基。轻轻加入 4ml 无血清培养基（如纯 DMEM 或 HBSS 培养基）以洗除残留的含血清培养基。然后再去除 DMEM，往每瓶 $25cm^2$ 组织培养瓶内加入 2.5ml Opti-MEM Ⅰ 培养基。放回 37℃，5％CO_2 培养箱约 10min。

在清洗 293 细胞时需特别谨慎，因为 293 细胞与瓶壁的黏附力往往较低。

18. 往 $25cm^2$ 组织培养瓶内逐滴加入 DNA/脂质转染 AMINE 试剂混合液，然后再将其放回培养箱内。
19. 4～6h 后，去除含有 DNA/脂质转染 AMINE 试剂混合液的培养基，然后加入 7ml 新鲜的完整 DMEM。

如果发现大量的悬浮细胞，则不要更换含有 DNA/脂质转染 AMINE 试剂混合液的培养基，而是往瓶内加入 6.0ml 的完整 DMEM，再放回培养箱培养 10～12h。然后去除培养基，再向每瓶内加入 7ml 新鲜的培养基。

20. 如果使用的是 pAdTrack-based 载体，则可通过 GFP 的表达，利用荧光显微镜监测转染效率和病毒产物。已转染的细胞应置培养箱内持续培养 10～12d。这一期间，

无需更换培养基。

一般来说，直到转染后两个星期，显微镜下都应观测不到明显的噬斑和细胞病变效应。然而，转染后5～7d，荧光显微镜下通常可观察到GFP斑。而是否观察得到“彗星样”噬斑，依赖于转染效率。低转染率（10%～30%）可能产生彗星样噬斑，然而高转染率（>50%）可能产生“散射星状”现象。

21. 转染10～12d后，用细胞刮（不能使用胰酶消化）刮下细胞，并转移至50ml锥形离心管内。

    如果转染效率较低（<30%），更偏向于在转染15d后收获细胞，以保证理想的初始病毒滴度。这种情况下，在转染10d后应加入2ml新鲜培养基继续培养细胞。

22. 500*g*，4℃离心细胞10min，然后再用3.0ml HBSS或灭菌PBS重悬细胞。
23. 干冰/甲醇浴冷冻细胞，37℃水浴解冻以从细胞释放病毒。剧烈地旋转。再重复冷冻/解冻/旋转3个循环。一旦解冻则迅速从水浴中移出管子以避免加温的病毒浮于上层，否则会降低滴定率。
24. 500*g*，4℃短暂离心样品，使细胞碎片形成球形。如果不立即用于感染，－20℃或－80℃保存病毒溶胞产物。

备选方案　用AdEasier细胞生产重组腺病毒质粒

在Stratagene公司可购买到多能AdEasier细胞（称为BJ5183-AD-1）。这对于只进行少量腺病毒构造来说尤其方便。

附加材料（基本方案；标√的条目参见附录1）

pAdEasier-2质粒（Quantum Biotechnologies或Stratagene的都可以）
√LB琼脂糖板含50μg/ml氨苄青霉素、30μg/ml链霉素
限制性内切核酸酶（*Hind*Ⅱ或*Pst*Ⅰ）
√LB培养基，不含抗性
√LB培养基，含25μg/ml卡那霉素

1. 转化50ng pAdEasy-1或pAdEasy-2质粒至电感受态的BJ5183细胞，条件如下（基本方案，第8步）。
2. 将转化混合物（通常5%～10%）铺至含50μg/ml氨苄青霉素、30μg/ml链霉素的LB琼脂糖板，37℃培养15～20h。
3. 挑取10～20个克隆于2ml含氨苄青霉素、链霉素的LB培养基，37℃摇床培养过夜。
4. 以任一个标准的碱裂解方法纯化各个克隆的质粒DNA。
5. 限制酶（*Hind*Ⅱ或*Pst*Ⅰ）消化20%～30%小量制备的DNA以确认质粒。选取一个经确认的克隆（指定为AdEasier-1或AdEasier-2）用于后续试验。
6. 准备电感受态AdEasier细胞，除用含氨苄青霉素、链霉素的LB培养基外，方法见支持方案3。
7. 以20μl/管储存电感受态AdEasier细胞，部分保存于－80℃，可保存6个月。转化时溶解一部分并置于冰上。

8. 克隆基因至穿梭载体，用 *Pme* Ⅰ 消化（见基本方案，第 1～5 步）。
9. 每 20μl 电感受态 AdEasier 细胞加 8μl 用 *Pme* Ⅰ 消化的穿梭载体。限制终体积为 30μl。
10. 将细菌/DNA 混合物小心转移至冰镇的 2mm 电穿孔杯，避免泡沫形成并将之置于湿冰上。在 Bio-Rad Gene Pulser 电穿孔仪上以 2500V，200Ω，25μFD 的脉冲穿孔。
11. 用 500ml LB 培养基重悬转化混合物。铺 10%～20%的转化混合物至 1～2 个 LB/卡那板，37℃培养过夜（16～20h）。
12. 挑 10～20 个最小的克隆，每个用 2ml 含 25μg/ml 卡那霉素的 LB 培养基 37℃旋转培养 10～15h，纯化、标记、重新生长质粒 DNA，见基本方案，第 11～13 步。

在 293 包装系生产重组腺病毒方法如前所述（基本方案，第 14～24 步）。

支持方案 1　制备并纯化高滴定度腺病毒

大多数情况下，需要放大 2～4 个回合以达到大规模制备高滴定度腺病毒。然而回合数主要决定于初级转染溶胞产物的初始滴定度。

附加材料（基本方案；标√的条目参见附录 1）

初级转染病毒上清（基本方案）
CsCl
矿物油
氯漂白剂
√2×储存缓冲液
空白溶液：等体积混合的 1.35g/ml CsCl 与 2×储存缓冲液
√TE 缓冲液，含 0.1%SDS（见个别处方）
75cm² 组织培养瓶
Benchtop 离心机
50ml 圆锥离心管
Sorvall 低温离心机，有 HS-4 转子
12ml 异质同晶聚合物管用于 SW 41 Ti 转子
Beckman（或相当产品）超离心机，有 SW 41 Ti 转子
站架、夹钳
3ml 吸管、18G 注射针头

回合 1：从初级转染溶胞产物放大

1. 感染前 12～15h 以 80%～90%的密度接种 293 细胞至 25cm² 组织培养瓶（3×10^6 个细胞/瓶含 6ml DMEM）。
2. 每瓶加 30%～50%的初级转染病毒上清感染 25cm² 组织培养瓶中 293 细胞。

感染时初级转染溶胞产物的用量主要决定于其初始滴定度（通常为 10^6～10^8 感染性颗粒/ml）。剩下的病毒溶胞产物储存于－20℃或－80℃。感染后 2～4d 细胞病变效应或确实的细胞裂解会变得明显。高产量的感染应该可以通过观察 pAdTrack-

based 载体的 GFP 的表达检测到。

3. 在 30%～50%的被感染细胞分离时（通常在感染后 3～5d）刮下并收集细胞。
4. 转移刮下的细胞至 15ml 圆锥离心管，500g，4℃离心 10min。去上清，5ml 培养基旋转重悬。
5. 干冰/甲醇浴冷冻细胞，37℃水浴解冻循环 4 次以从细胞释放病毒。用清洁的溶胞产物进行下一回合的放大或－80℃保存（可达一年）。

回合 2 和 3：中等规模的放大

6. 感染前 12～15h 以 90%的密度接种 293 细胞至 $75cm^2$ 组织培养瓶（5×10^6～7×10^6 个细胞/瓶含 16ml DMEM）。
7. 每 $75cm^2$ 组织培养瓶 293 个细胞加入 2～4ml 第 5 步制备的病毒溶胞产物。37℃，5% CO_2 培养箱中培养。
8. 在 30%～50%的被感染细胞分离时（通常在感染后 2～4d）刮下并收集细胞。
9. 转移刮下的细胞至 50ml 圆锥离心管，在 benchtop 临床离心机上 500*g*，4℃离心 10min。去上清液，10ml 培养基旋转重悬。干冰/甲醇浴冷冻细胞，37℃水浴解冻循环 4 次以从细胞释放病毒。用清洁的溶胞产物进行下一回合（第三回合）的放大或－80℃保存。氯漂白剂灭毒含有病毒的废弃物。
10. 用 3～5 个 $75cm^2$ 组织培养瓶重复第 6～9 步，进一步放大。收集被感染的细胞时，用 25ml 灭菌的 PBS 或 HBSS 重悬。冰冻/溶解 3 或 4 个循环释放细胞中的病毒。用清洁的溶胞产物进行下一回合的大规模的放大或－80℃保存。

    滴定度可以随时测定，在有 pAdTrack-based 时更容易。用不同浓度的病毒上清感染 293 细胞，18h 后计数表达 GFP 的细胞数。没有 AdTrack 病毒可以斑点滴定（支持方案 2）或通过用标准方法限制浓度来滴定。放大 3 回合后，病毒滴度应该达到每毫升溶胞产物含 10^9～10^{10} 个感染颗粒（或块状单位）。

回合 4：大规模放大以及 CsCl 密度梯度离心纯化

11. 感染时 90%～100%的密度接种 293 细胞至 15～20 个 $75cm^2$ 组织培养瓶（1×10^7 个细胞/瓶）。
12. 以 10pfu/个细胞用病毒上清多重感染细胞。
13. 当所有细胞变圆并且一半以上独立时（通常感染后 3～4d），从所有瓶中收获并混合细胞，benchtop 离心机 500*g* 离心 5min，去上清。氯漂白剂灭毒含有病毒的废弃物。
14. 8ml 灭菌 PBS 重悬细胞团。干冰/甲醇浴冷冻细胞，37℃水浴解冻循环 4 次以从细胞释放病毒。低温离心机上 7000*g*，4℃离心 5min。
15. 称取 4.4g CsCl 于 50ml 圆锥离心管，转移 8ml 清洁的病毒上清至里面（避免成团），旋转充分混匀。
16. 转移上述 CsCl 溶液（约 10ml，1.35g/ml）至一个 12ml 用于 SW 41 Ti 转子的异质同晶聚合物管。以 2ml 矿物油覆盖填充该管子，准备一个平衡管，176 000*g*，10℃超速离心 18～24h。

17. 取出管子，夹至一个置于一装满氯漂白剂的烧杯之上的站架上。标记病毒带纹的位置，为矿物油界面下 1～2cm 一个狭窄的白色不透明带。用 18G 注射针头从该带旁边穿刺吸取部分病毒（0.5～1ml）至 3ml 吸管，注意不要收集到其他带纹部分。
18. 以等体积 2×储存缓冲液混合部分病毒。原种储存于−80℃。通过 GFP、板块分析（支持方案 2）或免疫组织化学，或者直接测量 OD_{260} 检测病毒滴度。测量 OD_{260} 时，加 15μl 病毒和 15μl 空白溶液至 100μl TE/0.1%SDS，旋转 30s，离心 5min，测量。

    1OD 单位含有 10^{12} 个病毒颗粒/ml（颗粒：感染颗粒＝20：1）。将浓缩的病毒原种储存于−80℃最好，因为病毒颗粒在高盐条件中更稳定。病毒原种在体外高度稀释应用时，经纯化的病毒制剂可以直接用。但在其他情况下，由于 CsCl 可能会产生干扰或产生细胞毒性，最好在应用之前立即去盐柱或琼脂糖管透析去盐（支持方案 5）。

支持方案 2　腺病毒板块分析

附加材料（基本方案；标√的条目参见附录 1）

腺病毒
2.8%（*m/V*）Bacto 琼脂（Becton Dikinson）
2×Basal Medium Eagle（BME；Life Technologies）
1mol/L HEPES
√1.0mol/L $MgCl_2$
胎牛血清
100×氨苄西林/链霉素溶液（如 Life Technologies）
100×中性红原料（Life Technologies）
6 孔板
45℃水浴箱

1. 以 50%～70%的密度接种 293 细胞至 6 孔板（2×10^5～5×10^5 个细胞/孔含 5ml DMEM）。
2. 在 10～50μl 体系中，根据腺病毒滴度确定一个合适的 6 个 10 倍稀释范围（通常为 10^{-3}～10^{-8}μl /孔）。充分准备每个梯度的量，以备复杂的分析所需。
3. 去除每个孔中的上清，加入 2ml DMEM。将前面制备的 6 个浓度的腺病毒分别加入 6 个孔中感染 6～16h。每个孔都保留一个副本。
4. 高压灭菌 100ml 2.8% Bacto 琼脂用作覆盖琼脂，45℃水浴箱中保持温热。
5. 如下制备 100ml 覆盖混合物（每 6 孔板需要 25ml）：
   50.0ml 2×Basal Medium Eagle（终浓度 1×）；
   2.0ml 1mol/L HEPES（终浓度 20.0mmol/L）；
   1.25ml 1.0mol/L $MgCl_2$（终浓度 12.5mmol/L）；
   10.0 胎牛血清（终浓度 10%*V/V*）；
   1.0ml 100×氨苄青霉素/链霉素溶液（终浓度 1×）；
   充分混合，37℃水浴箱中预热；

36ml 2.8% Bacto 琼脂（终浓度 1.0%）；

充分混合，37℃水浴箱中旋动。

6. 从孔中吸走 DMEM，沿着孔边沿慢慢地加入 4ml 预热的覆盖混合物，注意不要移动细胞。
7. 室温下放置 10～20min，让覆盖混合物凝固。为避免覆盖混合物在板块形成以前凝固，加灭菌的 PBS 或 HBSS 至孔之间的空间，用塑料包裹物包裹 6 孔板。置于 37℃培养。
8. 第 5 天，在原有覆盖混合物上再加 1.5ml 每孔的覆盖混合物营养细胞并使其保持严格的单细胞层。放回 37℃培养。
9. 第 9 天，制备含中性红的覆盖混合物，50ml 覆盖混合物中加入 500μl 100×中性红，每孔 2ml 此覆盖混合物覆盖。
10. 室温下放置 10min，让覆盖混合物凝固。置于 37℃培养。
11. 12～20h 后，取出 6 孔板，灯下或光盒上从其底部观察单细胞层。计数每孔中的板块数，板块为一个青灰色圆形区，中央有一个颜色更深的红橙色单细胞层。
12. 计算两套 6 孔板每个梯度的板块平均数。这个平均数决定腺病毒原种的滴度，以板块形成单位每毫升（pfu/ml）表示。由于病毒编码 GFP，可通过在荧光显微镜下计数 GFP 焦点数来确定感染性单位的滴度。

支持方案 3　电能 BJ5183 细胞制备

附加材料（基本方案；标√的条目参见附录 1）

√LB 培养基，含链霉素 30μg/ml

10%（V/V）灭菌甘油，冰镇

10ng/μl pAdEasy-1 质粒 DNA

√LB 琼脂糖板，含氨苄青霉素 50μg/ml

50ml 圆锥离心管

250ml 灭菌离心管，（用于 IEC 离心机）

IEC 离心机（或相当）

1.5ml 微离心管，−80℃预冷

1. 在 50ml 圆锥离心管用新鲜 BJ5183 菌落或原种接种 10ml 含 30μg/ml 链霉素 LB 培养基，37℃摇床培养过夜。
2. 取 1ml 上述细胞，接种至 1000ml 含 30μg/ml 链霉素 LB 培养基中，通气良好下 37℃摇床剧烈振动培养 4～6h，直到 A_{550} 达到 0.8。
3. 收集细胞至 4 个 250ml 灭菌离心管，冰上接种 1～3h（接种时间越长，其能力越大），2600g，4℃离心 10min。
4. 去上清，重悬于 1000ml 10%冰镇的灭菌甘油以洗细胞团。将重悬的细胞以 2500g，4℃离心 20min。重复洗一次。
5. 倒出大部分上清，然后用移液管轻轻的吸出残留的上清，每个 250ml 灭菌离心管留 10ml 左右。混合并转移细胞悬液至一 50ml 离心管中，2500g，4℃离心 10min。

6. 去掉大部分上清，加 40ml 10%冰镇的灭菌甘油重悬细胞，2500g，4℃离心 10min。
7. 吸去上清，留 2ml 重悬细胞团。每个预冷的 1.5ml 微离心管分装 20μl，保存于 −80℃。
8. 为验证其能力，加入 1.0μl 10ng/μl 的 pAdEasy-1 质粒 DNA 至 20μl 制备好的 BJ5183 细胞。
9. 转移细胞/DNA 混合物至冰镇的 2mm 电转杯，在 Bio-Rad Gene Pulser 上以 2500V，200Ω，25μFD 进行电穿孔。
10. 一个 50ml 圆锥离心管中，加 1ml LB 培养基至细胞，37℃摇床培养 1～2h。
11. 在 LB 培养基中配制 100 与 1000 倍的细胞浓度。铺 100μl 各个浓度的细胞至含氨苄青霉素 50μg/ml 的 LB 琼脂糖板，37℃温箱中培养过夜（滴度应该大于 10^8 克隆/μg DNA）。

支持方案 4　腺病毒 DNA 的制备

附加材料（见基本方案；标√的条目参见附录 1）

病毒溶胞产物或 CsCl 密度梯度离心纯化病毒原种
10% SDS
0.5mol/L EDTA
20mg/ml PCR 级别蛋白酶 K（Life Technologies）
√7.5mol/L 乙酸亮丙瑞林铵
seeDNA（Amersham Biosciences）
PC-8（Fisher）或 25∶24∶1（$V/V/V$）苯酚/氯仿/异戊基乙醇（附录 1）
70%和 100%乙醇
55℃水浴箱

1. 每 100μl 病毒溶胞产物或 10μl CsCl 密度梯度离心纯化病毒原种，加 7μl 10% SDS，3μl 0.5mol/L EDTA，20μl 20mg/ml 蛋白酶 K。充分混合，在 55℃水浴箱温浴 3h。95℃热激 5min。
2. 以去离子蒸溜水将病毒 DNA 溶液总体积加至 200μl，然后加 100μl 7.5mol/L 乙酸亮丙瑞林铵、2μl seeDNA。
3. 300μl PC-8 抽提两次混合物。转移上相至一个新的 1.5ml 微离心管，避免取到界面物质。加 600μl 100%乙醇。
4. 以最大速度离心微离心管 10min，使病毒 DNA 沉淀。70%乙醇洗两次，50μl 水溶解病毒 DNA。

支持方案 5　快速琼脂糖柱透析

材料

琼脂糖，分子生物学级
2ml 微离心管
200μl 过滤器 tip

1. 在微波炉最高温度下熔化琼脂糖与去离子蒸馏水混合物，制备1%的琼脂糖。
2. 吸取1ml熔化的琼脂糖至2ml微离心管作一个透析柱装置。将一个斜削的吸头粘在柱子的最底部。
3. 室温下静止1h，取出吸头。加50μl去离子蒸馏水在孔中，保持凝胶湿润。4℃保存柱子。
4. 透析时，去掉水，用注射针吸头加入病毒原种溶液（一般小于25μl）。
5. 一段时间后（通常10～20min），用注射针吸头去掉病毒原种溶液，可以直接使用，如有必要可再重复透析一次。

参考文献：Becker *et al.*，1994；He *et al.*，1998；Shenk，1996

编者：Tong-Chuan He

单元12.3 重组腺相关病毒载体的生产

图12.3.1所示为重组腺相关病毒载体的生产程序。这种病毒可用来感染组织培养细胞，也可以直接注射至动物活体内（单元13.3和13.5）。

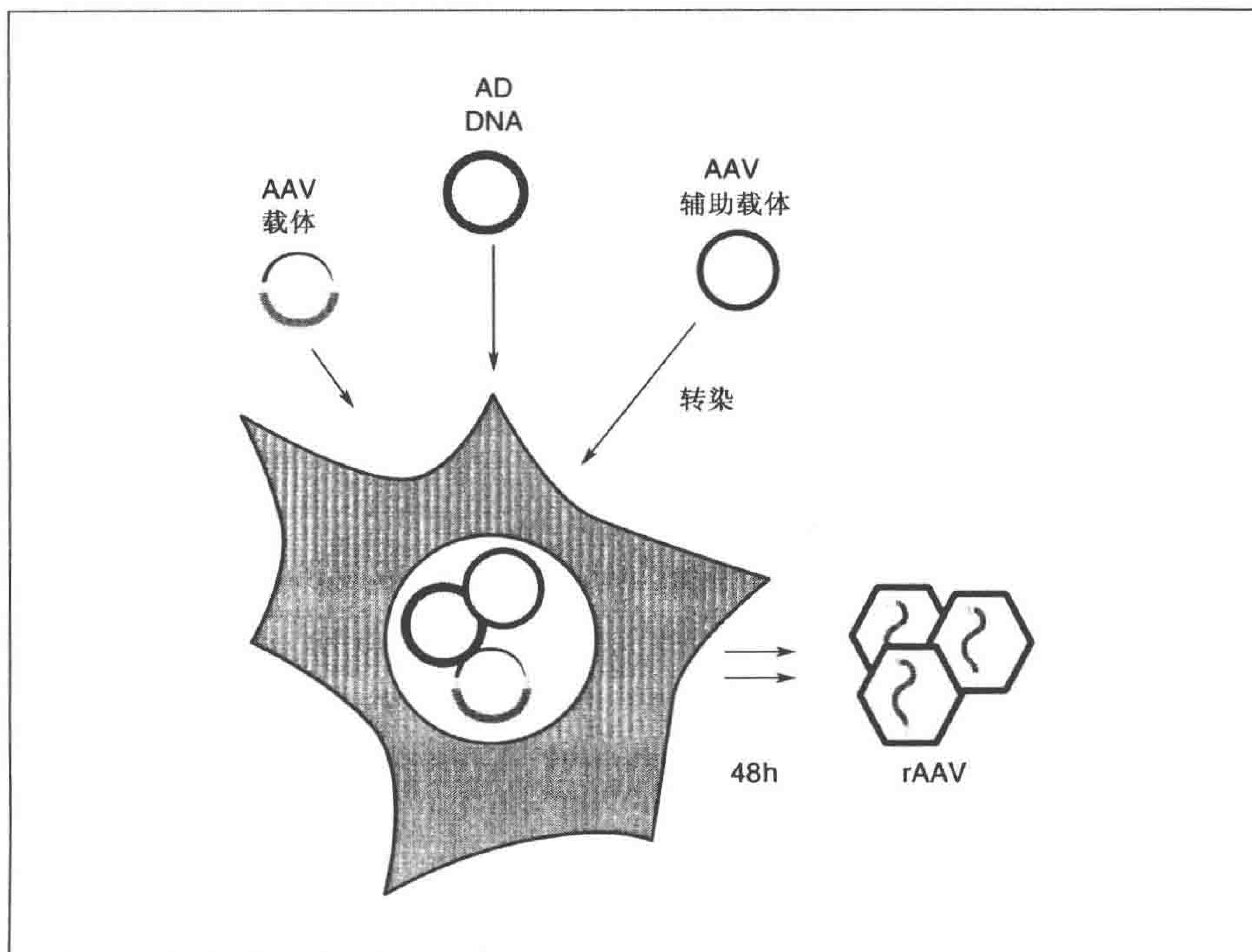


图12.3.1　无腺病毒的重组腺相关病毒制备。三质粒同时转染293细胞（加入了Ad *E1*基因）。这三质粒包括：携带目的基因的质粒（sub201基因“*X*”，AAV载体），加入了AAV2复制和病毒外壳基因同时去除了末端重复的载体（pXX2，AAV辅助载体）和携带了腺病毒辅助基因*E2*、*E4*和*VA* RNA基因的质粒（pXX6，AD DNA），因此产生无腺病毒的rAAV。

注意：病毒工作应在专用的组织培养罩和培养箱进行，与其他维持实验室细胞系所用的组织培养罩和培养箱分开。含有病毒的物质应当有适当的处理。

注意：所有与组织培养细胞（感染的或没有感染的）相关的器材与试剂以及由 CsCl 密度梯度离心纯化的病毒都应该灭菌。

注意：除特殊要求外，所有组织培养箱应为增湿 37℃，5% CO_2 培养箱。

基本方案　瞬时转染 293 细胞制备无腺病毒重组腺相关病毒载体

附加材料（标√的条目参见附录 1）

pSub201 质粒：用于克隆腺相关病毒载体末端转基因（图 12.3.2；ATCC＃68065；见 http://www.med.unc.edu/genether/）

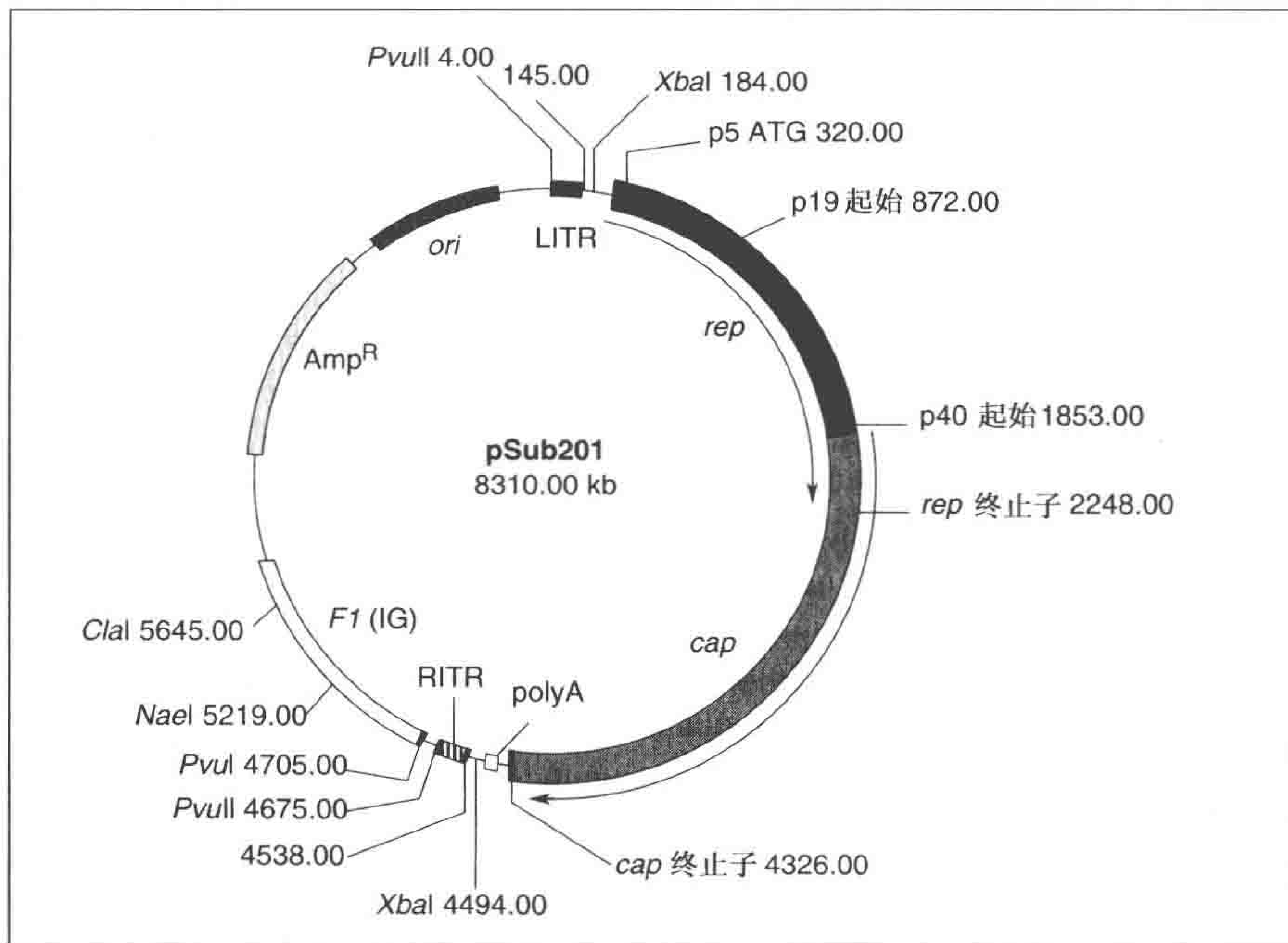


图 12.3.2　Sub201 的质粒图。该质粒包括末端重复序列、AAV 2 型的重复序列（*rep*）及其外壳（*cap*）基因。*rep-cap* 片段能被其他目的基因所替换，只有末端重复序列是组装所必需的。

Xba Ⅰ，*Hind*Ⅲ 限制性内切核酸酶及其缓冲液

pXX2 质粒：腺相关病毒载体辅助质粒（UNC Vector Core Facility；见 http://www.med.unc.edu/genether/）

pXX6 质粒：腺相关病毒载体辅助质粒（UNC Vector Core Facility；见 http://www.med.unc.edu/genether/）

293 组织培养细胞系（ATRCC＃CRL1573）

√完全 DMEM/10%FBS 培养基

√完全 IMDM/10%FBS 培养基

0.05%（*m/V*）猪胰蛋白酶/0.02%（*m/V*）EDTA

√2.5mol/L $CaCl_2$

√2×HEPES-buffered saline [HeBS，是一种软接触镜保护液（含硫柳汞、硼酸和EDTA）]

√纯 DMEM/2%FBS 培养基

干冰/乙醇浴

硫酸铵

OPTI-MEMI（Life Technologies）

√饱和硫酸铵，pH7.0，4℃

√1.37g/ml、1.5g/ml 密度的 CsCl

70%乙醇

√PBS

15cm 组织培养板

50ml 一次性聚苯乙烯及聚苯乙烯离心管

细胞刮

250ml 聚苯乙烯离心瓶

Sorval 离心机，具有 GS-3 和 SS-34 转子或相当产品

超声破碎器，具有 3mm 探针

桌面（tabletop）离心机

50ml 高速聚丙烯离心管。

Beckman 超高速离心机带 SW-41 转头和 12.5ml 干净 Beckman 抗高压管（或等效物）。

21G 针

Slide-A-Lyzer 穿孔透析盒

1. 用限制性内切核酸酶 *Xba* Ⅰ 和 *Hind*Ⅲ 消化 pSub201 质粒（图 12.3.2），切下 *rep* 和 *cap* 片段，纯化长 4000bp 含 AAV ITR 的骨架。在 *Xba* Ⅰ位点插入目的外源基因构建 rAVV 质粒载体。通过双 CsCl 梯度分离法将 rAVV 载体、pXX2 和 pXX6 质粒大量纯化（至少 1mg）。
2. 在 15cm 的皿中种 2107 细胞以期在第二天早上达到 70%～80%融合率。保持 293 个细胞线在含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基中，将皿中接近融合的细胞通过 0.05%胰酶的 EDTA 消化（见附录 3Ⅰ）后分装到 4 或 5 个 15cm 皿中扩大培养（本实验共需 20 个皿）。
3. 扩大培养 12～16h，将每个 15cm 皿中培养基弃除，加入 25ml 含 10% FBS 的 IMDM 完全培养基。孵育 3h 后开始转染细胞。
4. 为了转染 4 个 15cm 皿，将下列物品在一次性地于 50ml 聚丙乙烯管中混合：

   90μg pXX 6 辅助质粒（腺病毒辅助基因）；

   30μg rAAV 细菌质粒；

   30μg pXX 2 辅助质粒（AAV 辅助基因）；

   0.4ml 2.5mol/L $CaCl_2$ 溶液；

加去离子水至 4ml。

总 DNA 量约为 37.5μg/板，且 AAV 辅助质粒、Ad 辅助质粒和 rAAV 细菌质粒的摩尔比约为 1∶1∶1。

5. 加 4ml 2×HeBS 溶液于第 4 步所得混合物，用 10ml 塑料移液管吹吸 3 次混匀。室温孵育 1～5min。在 40×显微镜下可见明显沉淀（如果沉淀过粗，减少孵育时间）。
6. 将含 DNA/ $CaCl_2$ 沉淀的悬液摇 5s 混匀，然后向 4 个 15cm 平皿中的细胞分别逐滴加入 2ml 第 3 步所配培养基。摇平皿使溶液分散开。
7. 重复第 4～6 步每次转染 4 个皿，直至 20 个皿转染完毕。孵育细胞 24h。
8. 孵育 24h 后，吸出培养基（为防止细胞脱水，一次操作两个平皿），然后加预热至 37℃ 的含 2% FBS 的 DMEM 25ml。孵育细胞直至 48h 后转染完毕。
9. 用细胞刮从组织培养平皿中把细胞刮下，收获细胞和培养基从而收获细胞和上清液，将悬液转至 250ml 聚丙烯离心管中。
10. 将悬液放入干冰/乙醇浴中和 37℃水浴箱中反复冻融（除去病毒质粒）3 次（悬液可在－20℃下保存 6 个月）。
11. 4℃，3000*g* 离心 10min 沉淀细胞。倒上清至另一新的 250ml 聚丙烯离心管。分开保存上清液和细胞沉淀。
12. 为了沉淀上清液中的病毒，每 250ml 上清液中加入 $(NH_4)_2SO_4$ 78.25g，充分混匀硫酸铵，然后继续冰上沉淀 20min。4℃，8300*g* 离心 10min。
13. 轻轻将上清液倒入另一容器，将其与离心管壁上和底部的浅黄色沉淀分离开。高压灭菌处理上清液（勿用漂白剂）后弃之。将含有沉淀的离心管继续放在冰上沉淀，直到第 11 步的沉淀处理好。
14. 往第 11 步所制的沉淀中加入 20ml OPTI-MEM Ⅰ培养基，用吸管上下吹打或旋匀使沉淀溶解。转至一次性 50ml 聚丙烯离心管。
15. 戴上声保护装置，室温下在病毒组织培养盖中声处理细胞沉淀（40bursts，50%的功率，力度 2）。见沉淀变成混浊细胞溶液。
16. 室温 3000*g* 离心 5min，用于沉淀不溶解的碎片。收集澄清上清液并转至一个一次性的 50ml 聚丙烯离心管中。
17. 用 20ml OPTI-MEM Ⅰ培养基重新溶解沉淀，重复第 14～16 步。
18. 混合第 16～17 步所得上清液。用吸管将这些混合后的上清液吹打离心管（第 13 步所得）壁及底部使得硫酸铵沉淀溶解。
19. 量得第 18 步所得液体体积，将饱和硫酸铵与 pH7.0 的含病毒的悬液按 1∶3 的比例混合。混匀后，置于冰上 10min。
20. 4℃，7700*g* 离心 10min（可见管底有黄色沉淀）。将每种上清液转至 50ml 高速聚丙烯离心管。
21. 根据第 18 步所得溶解产物体积，将 4℃饱和硫酸铵溶液和溶解产物按 2∶3 的比例混合，将此样本置于冰上 20min。
22. 4℃，17 000*g* 离心 20min，此时有大量沉淀形成。将沉淀移出，弃上清前高压灭菌（勿用漂白剂）。
23. 用 20ml（共 20～40 个平皿）1.37% 的 CsCl 溶解沉淀，当沉淀尽可能完全溶解时，

混合后，才看不见不溶物。

24. 往 2 个 12.5ml 的超净管中分别加入 0.5ml 1.5g/ml 的 CsCl 溶液。将管倾斜，再分别缓慢加入约 12ml 病毒标本覆盖 1.5g/ml 的 CsCl 溶液。随着标本的配制将管子沿着边缘竖立起来。
25. 15℃，288 000*g* 离心标本 36～48h。以 500r/min 的速度减速，而后关闭刹车阀。在管的中央可见一可能存在的弥散性的 AVV 环。
26. 用 70%的乙醇擦拭离心管的外部，在管底部呈 90°角插入一 21G 针 1cm 使得这一角度可以导入无菌微管。每管 10 滴，收集 15～20 份。
27. 用一 rAVV 特有探针通过打点从每份样本中取 1～5μl 来测定找出高峰（见支持方案 1）。

    rAVV 峰值在 1.40～1.42g/ml 梯度，可以用折光计验证（用后需将折光计擦干净）。
28. 可选做：加 1.37g/ml CsCl 溶液至每份中使得终体积为 12ml。加 0.5ml 浓度为 1.5g/ml CsCl 溶液至一超净管中，将病毒溶液置于其上如第 24 步，重新离心，导入管子，测定梯度同第 25～27 步。
29. 4℃，用 MWCO 10 000 Slide-A-Lyzer 透析盒加入 3 次 500ml 无菌 1×PBS 透析 rAVV，至少 3h（或过夜）。
30. 将病毒溶液等量分装（一般 100～200μl）以避免反复冻融。菌液可在－20℃或－80℃保存至少一年。

备选方案　用肝素纯化柱纯化 rAVV

附加材料（基本方案；标√的条目参见附录 1）

√PBS-MK
√15%、25%、40%和 60%碘克沙醇
PBS-MK 包含 1mol/L NaCl
0.5mol/L NaCl
20%（*V*/*V*）乙醇
酚红（Life Technologies）
乙醇
Econopump 蠕动泵（Bio-Rad 公司）
32.4ml 密封玻璃管（Beckman 公司）
50μl 硅酸硼毛细玻璃移液管（Fisher 公司）
Beckman 超级离心管和 70Ti 转头（或等效物）
1ml 或 5ml HiTrap 肝素柱（Amersham Biosciences 公司）
FPLC 仪
Slide-A-Lyzer 穿孔透析盒（MWCO 10 000）

1. 开始转染，从 rAVV 中去除硫酸铵沉淀（基本方案，第 1～22 步），用 PBS-MK 溶解硫酸铵沉淀，加至 15ml 刻度线。

2. 启动 Econopump，将一次性硅酸硼毛细玻璃管插入管中。按照说明书校对泵。将溶有磷酸盐沉淀 PBS-MK（第 1 步所得）等量分装于两个密封玻璃管中。
3. 每个管中插入一毛细玻璃管，以 3ml/min 的速度抽吸，用 6ml 15%碘克沙醇和 1mol/L NaCl 无气泡地将菌液覆盖。
4. 用第 3 步的技术，先后加入 5ml 的 25%碘克沙醇和 5ml 40%的碘克沙醇（迅速包含病毒）覆盖菌液。
5. 加入 5ml 60%的碘克沙醇覆盖后设置了梯度，小心移动毛细玻璃管而不打乱梯度。缓慢往病毒溶液中加入 PBS 形成管的最上层直到管被装满。
6. 每管盖上塞子，15℃～25℃，500 000g 离心 1h。
7. 小心移动管子，在病毒罩中，打开密封塞，插入一与 5ml 注射器相匹配的 18G 针头至 60%碘克沙醇那部分之上，抽出 40%碘克沙醇溶液（明显分层），留下的 0.5ml，所以 25%碘克沙醇溶液带不会被抽出来（图 12.3.3）。有需要的话 4℃保存病毒过夜。

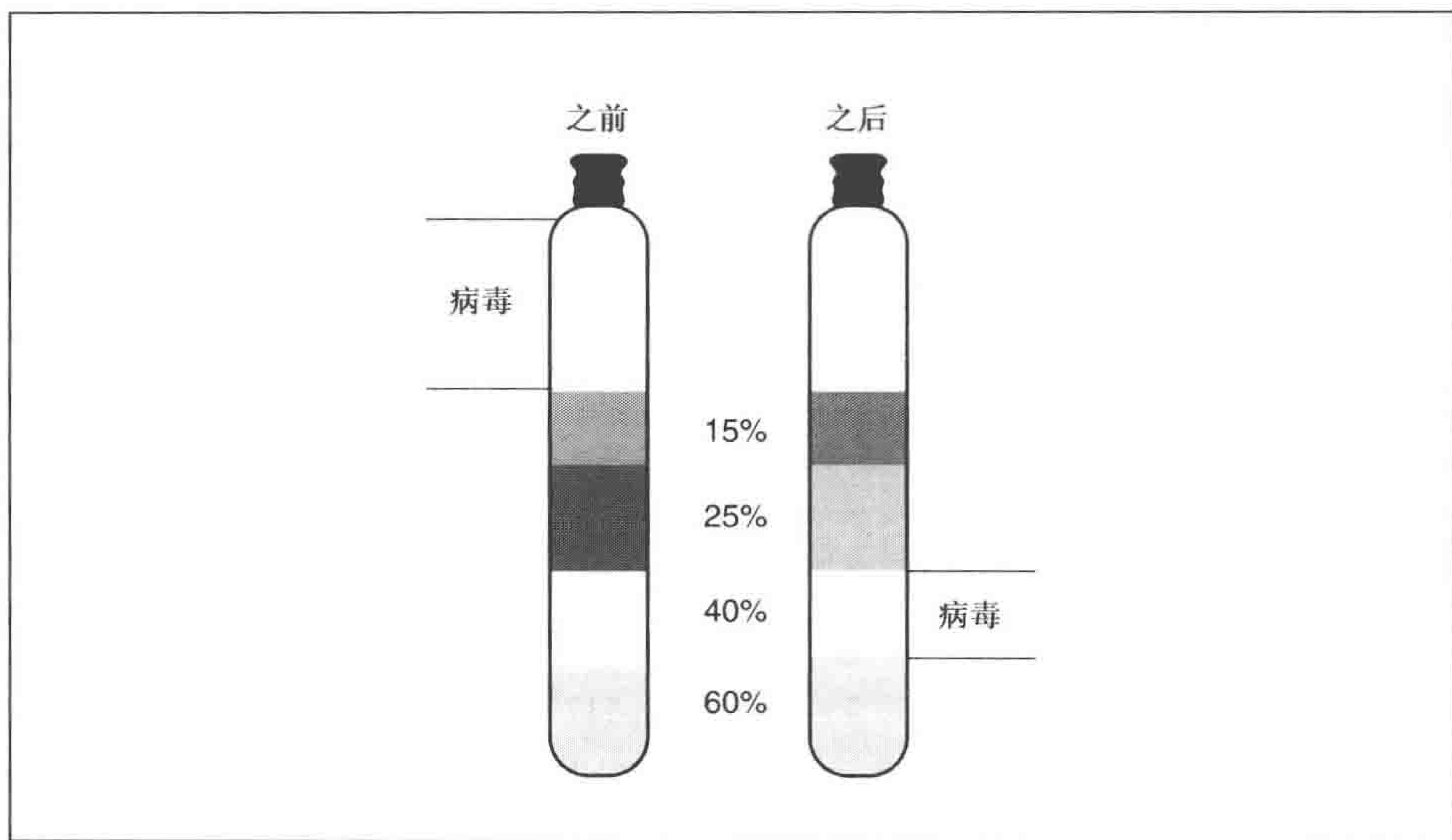


图 12.3.3　离心前后碘克沙醇的梯度。梯度是由覆盖病毒的浓度为 15%、25%、40%和 60%的碘克沙醇产生的（见形成梯度的交替实验）。比率和溶液中碘克沙醇含量的百分数有关。离心后病毒只存在于 40%的碘克沙醇（清晰可见）层。在移出这一层时需小心，勿将含细胞碎屑的 25%碘克沙醇层吸出。

8. 用缓冲液 A（PBS-MK）泵洗，然后在 FPLC 中插入一肝素柱。

   来自 20 个 15cm 平皿的一种病毒可用一个 1ml 的肝素柱纯化，更大量则需一 5ml 肝素柱。

9. 用 5 倍柱体积的缓冲液 A（PBS-MK）平衡柱。为了注射标本，将抽吸速度减为 1ml 柱 0.2ml/min 或 5ml 柱 1ml/min，然后注射标本。收集过柱的部分（洗涤，流过，洗脱）。
10. 用 5 倍柱体积的缓冲液 A（PBS-MK）洗柱。
11. 用 5 倍柱体积的缓冲液 B（含 1mol/L NaCl 的 PBS-MK）按线性梯度从 0%～100%

洗脱联合病毒，收集其中的 0.5ml（1ml 柱）或 1ml（5ml 柱）。

12. 用两倍柱体积的缓冲液 B（含 1mol/L NaCl 的 PBS-MK）洗柱。取出肝素柱弃之。
13. FPLC 分析病毒前用 0.5mol/L 的 NaOH 顺着内管流过灭菌。用 20%的乙醇装满内管保存。均用新的肝素柱纯化病毒避免准备好的病毒之间的交叉污染。
14. 为了找出病毒的高峰值（支持方案 1），用一 AVV 专用针通过打点的方法测定整个病毒纯化物的各部分。
15. 将含有最高 rAAV 滴定量的部分倒出，用 MWCO 10 000 Slide-A-Lyzer 透析盒将两个 1L 变化的 PBS 4℃透析 2h。
16. 将病毒悬液分成 100～200μl 的等份。－20℃或－80℃下保存（可保存一年以上）。

支持方案 1　用打点分析法测定 rAVV 的滴定量

在这一部分有一明显标志表明 rAVV 病毒体制备成功，且定量得出每毫升有一定量的病毒体。

材料（标√的条目参见附录 1）

病毒部分或终病毒的准备（基本方案或备选方案）
√DNase 消化缓冲液
√0.1mol/L EDTA
√蛋白水解酶溶液
0.5mol/L NaOH
用于重组病毒的 rAAV 质粒（基本方案，第 1 步）
√TE buffer ，pH7.5
0.5mol/L NaOH 包含 1mol/L NaCl
√0.4mol/L Tris·Cl pH7.5
0.5mol/L NaCl 包含 0.5mol/L Tris·Cl ，pH7.5
转基因用放射性标记探针（根据生产商的说明书，用 Boehringer Mannheim 随即引物 DNA 标记试剂盒进行操作）
96 孔板
50℃水浴箱
圆点印记仪
0.45μm 尼龙膜（Zeta-Probe，Bio-Red）

1. 设计一个于 96 孔板成对地对样品、控制样、标准 DNA 定位的实验方案。
2. 将样品（通常加 5μl CsCl，如果这种病毒有 CsCl 则取柱子纯化的 20μl 混合物）和控制样于 96 孔板的适当位置，在每个孔中加 DNase 消化液 60μl 并 37℃孵育 1h。
3. 每孔加 10μl 0.1mol/L 的 EDTA 停止消化，混匀。加 60μl 蛋白酶溶液使病毒体 DNA 释放，50℃孵育半小时。
4. 每孔加 120μl 0.5mol/L NaOH 使病毒 DNA 变性，并在室温下孵育 10min。
5. 准备线性化的质粒（用于这种病毒转染的质粒）0.1μg/μl 用于制备 DNA 标准浓缩物。用 100μl 、pH7.5 的 TE 缓冲液制备稀释 5 倍的溶液，通过加 12.5μl DNA 到

112.5μl TE 缓冲液（在第 1 步）紧接着混合 25μl 从一个孔到邻近的孔（分别为 625ng、125ng、50ng、1ng、200pg、40pg）。

6. 加 100μl 0.5mol/L NaOH /1mol/L NaCl 到每个孔来变性 DNA 标准物。
7. 用 pH7.5 的 0.4mol/L Tris · Cl 平衡尼龙膜，准备提前润湿的尼龙膜的圆点印记复合仪。
8. 加没有经过真空处理的变性 DNA，接着做真空处理。
9. 打开仪器，取出尼龙膜，于 100ml pH7.5 的 0.5mol/L NaCl/0.5mol/L Tris · Cl 中轻轻振荡清洗 5min。
10. 用放射物标记特异的 rAAV 序列探针（如 APPENDIX 3G）检测冲洗的滤膜。

    探针应该被限定在基因转化暗盒里并且不包括质粒的主链片段或 ITR 序列。

11. 将滤膜对准胶片曝光（放射性自显影）。显影结束后，对准部位，删除滤膜部分，用闪烁计数器进行定量分析。计算多少标准质粒分子复合给定的 rAAV 稀释液。

    切记质粒是双链 DNA，而 rAAV 病毒只包含单链 DNA 。

支持方案 2　细胞体外感染 rAAV 和用转基因表达进行效价研究

转导的效价随细胞类型的不同而有所差别，但对于标准的细胞株来说，转导效价可通过相同转基因 rAAV 的比较来得出。这种效价能通过确定特定细胞的特定转基因的效率的颗粒的数目来比较。当永生细胞株被培养和在体内转导相比较时效价也会不同。

注意： 为了评价转导效价，将细胞同时用腺病毒转导（见单元 12.2），这种方法起到了协助病毒和提高转导效率的作用。添加腺病毒能够诱导更适合 AAV 感染的环境，这样能更好地指示有转导能力的颗粒的数量。但是，由于腺病毒有抗原性并且不能在体内使用，所以它会有细胞病理效应。因此，用腺病毒在体外推导出的效价不能精确地反映体内的转导能力。这需要每位研究者分别对不同的 rAAV 试剂建立一套标准的滴定程序。

材料

靶细胞
靶细胞培养基（见补充的细胞说明书）
有适当的转基因的 rAAV（见基本方案或备选方案）
组织培养板（为分析转导的效价，推荐使用多壁板）

1. 在有合适的培养基的多壁组织培养板上种上适当的靶细胞。

    合适的靶细胞类型，数目和密度有表达分析来决定。细胞在感染前不能用 DNA 合成抑制剂（如阿糖胞苷）处理。AAV 是一种单链病毒，并且基因能够表达时需要合成双链。

2. 直接在细胞培养基中加 rAAV 或在加入细胞前将 rAAV 与新鲜培养基迅速混合。为分析转导效价，将 rAAV 原液用血清稀释 5 倍后感染细胞。

    也可以在种板的时候感染细胞。孵育时间依分析方法而定。合适的 rAAV 的数量由转移基因、细胞和分析方法决定。当感染复数为 5 时（见上注解），5 型腺病毒可以随意的与 rAAV 一起加入。

3. 实现对转基因表达的特定分析（如免疫荧光、组织学染色、耐药性）。

参考文献：Samulski *et al.*，1999；Xiao *et al.*，1998

编者：Rebecca A. Haberman，Gabriele Kroner-Lux，and Richard Jude Samulski

单元 12.4 反转录病毒载体的制备

图 12.4.1 显示了病毒制备技术的一般过程。从反转录病毒质粒载体制备病毒取决于反转录病毒包装细胞的使用，包装细胞能合成所有反转录病毒蛋白但不会产生有复制能力的病毒。表 12.4.1 列出了最常用的用于哺乳动物基因转染的包装细胞株。

注：所有与细胞接触的溶液和用具必须被灭菌，相应地使用合适的灭菌技术。

注：除非特殊说明，所有培养物在 37℃，10% CO_2 饱和湿度的培养箱里。

表 12.4.1 反转录病毒包装细胞株

外壳蛋白[a]	名称	细胞株来源	最高滴度[b]	药物抗性基因[c]	参考文献
Ecotropic	ψ-2	小鼠	10^7	*gpt*	Mann *et al.*（1983）
	PsiCRE	小鼠	10^6	*hph*，*gpt*	Danos and Mulligan (1988)
	GP+E-86	小鼠	4×10^6	*gpt*	Markowitz *et al.* (1988a)
	PE501	小鼠	10^7	*tk*	Miller and Rosman (1989)
	ΩE	小鼠	?（高）	*gpt*	Morgenstem and Land (1990)
	ampli-GPE	小鼠	5×10^6	*neo*	Takahara *et al.* 1992
	BOSC 23	人	10^7	*hph*，*gpt*	Pear *et al.* (1993)
双向性	PA 317	小鼠	4×10^7	*tk*	Miller and Buttimore (1986)
	ψCRIP	小鼠	10^6	*hph*，*gpt*	Danos and Mulligan (1988)
	GP+*env* Aml2	小鼠	10^6	*hph*，*gpt*	Markowitz *et al.* (1988b)
	DAN	狗	4×10^4	*neo*	Dougherty *et al.* (1989)
	FLYA13	人	10^7	*bsr*，*ble*	Cosset *et al.*（1995）
GALV	PG13	小鼠	3×10^6	*tk*. *dhfr**	Miller *et al.* (1991)
VSV	GP7C-tTA-G10	小鼠	10^6	*hph*，*pac*	Yang *et al.*（1995）
RD114	FLYRD18	人	10^7	*bsr*，*ble*	Cosset *et al.*（1995）
10A1	PT67	小鼠	10^7	*tk*，*dhfr**	Miller and Chen (1996)

a. 缩写：GALV(gibbon ape leukemia virus)，长臂猿白血病病毒；RD114(RD114 endogenous cat retrovirus)，猫内源性反转录病毒 RD114；VSV (vesicular stomatitis virus)，水泡性口膜炎病毒；10A1 (murine leukemia virus)，鼠白血病病毒。

b. 报道的最高滴度(病毒颗粒数/ml)，有些数据来自描述细胞株的原始报道之后发表的文章。

c. 药物抗性基因是已经存于包装细胞中，共转染有缺陷的辅助病毒时用于控制 DNA 转移的，在这些包装细胞中携带这些标记的病毒载体不能生存。*ble*，一个能使哺乳动物细胞对博来霉素(bleomycin)和腐草霉素(phleomycin)产生抗性的细菌基因；*bsr*，一个能对杀稻瘟菌素 S(blasticidin S)产生抗性的细菌基因；*dhfr**，一个突变的二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase)基因；*gpt*，黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(xanthine-guanine phosphoribosyltransferase)；*hph*，潮霉素磷酸转移酶(hygromycin phosphotransferase)；*neo*，新霉素磷酸转移酶(neomycin phosphotransferase)；*pac*，嘌呤霉素 N-乙酰磷酸转移酶(puromycin N-acetyl phosphotransferase)；*tk*，单纯疱疹病毒胸苷(herpes simplex virus thymidine kinase)。

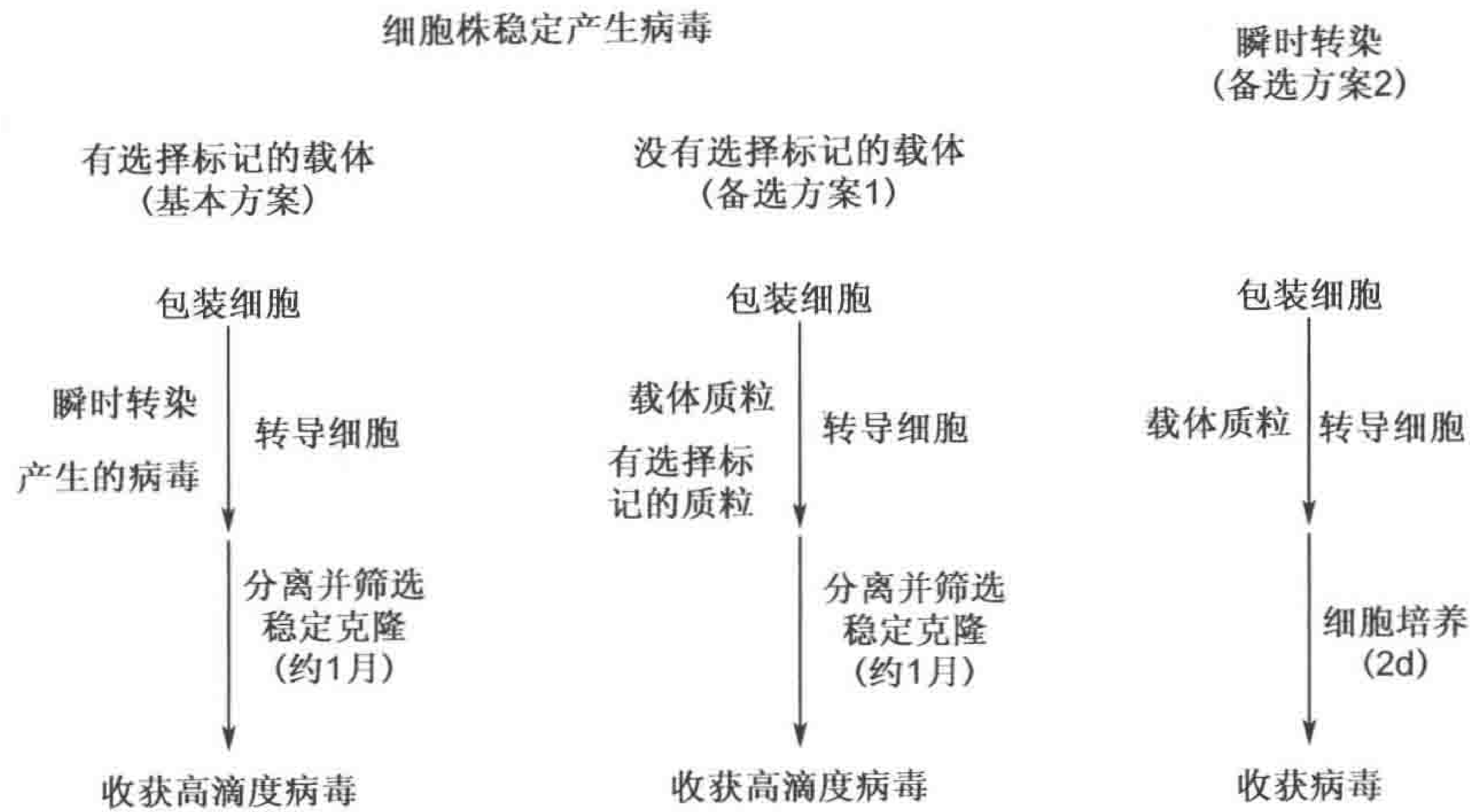


图 12.4.1　用反转录病毒载体质粒制备病毒。选择合适的包装细胞制品用于瞬时转染和转导步骤（表 12.4.3）。

基本方案　有选择标记的产病毒稳定细胞株的制备

值得注意的是，因为众所周知的病毒干扰现象，从某个包装细胞株中产生的病毒的感染能力是有限的，无论是感染相同的或是其他包装细胞株。病毒干扰是由于包装细胞产生的包膜蛋白结合到特异的反转录病毒受体上，从而阻止了使用同一受体进入的其他病毒的感染。此外，一些反转录病毒不能感染产生某种包装细胞的物种的细胞（表 12.4.2）。表 12.4.3 总结了可以转导特定包装细胞的假包膜型病毒载体，在下面的方案中选择使用包装细胞时需要考虑这些信息。

表 12.4.2　反转录病毒载体的宿主范围

病毒载体的假包膜	能被转导的细胞	
	小鼠	人
Ecotropic	Yes	No
Amphotropic	Yes	Yes
GALV	No	Yes
VSV	Yes	Yes
RD114	No	Yes
10A1	Yes	Yes

表 12.4.3　能感染其他包装细胞的假包膜

目的包装细胞		允许感染目的包装细胞的假包膜病毒[a]
假包膜	物种	
Ecotropic	小鼠	Amphotropic，VSV，10A1
Amphotropic	小鼠	Ecotropic，VSV，10A1
	人类	GALV，VSV，RD 114
	狗	GALV，VSV，RD114
GALV	小鼠	Ecotropic，amphotropic，VSV，10A1
VSV	小鼠	Ecotropic，amphotropic，10A1
RD114	人类	Amphotropic，VSV，10A1
10A1	小鼠	Ecotropic，VSV

a. 见表 12.4.1。

很多反转录病毒载体都适用于表达插入的来自文库的 cDNA 片段。对于大部分的试验，携带选择标记的反转录病毒载体是值得考虑的，尽管对于人类基因治疗来说，一般要求病毒载体只携带治疗基因以避免选择标记蛋白可能造成的免疫反应。

图 12.4.2 列出了一系列反转录病毒载体，它们包含选择性标记和唯一的 cDNA 插入克隆位点。这些病毒载体的命名是根据病毒载体上的基因元件：L，长末端重复（long terminal repeat ，LTR)；N，新霉素基因（neomycin gene ，*neo*)；S，猿猴空泡病毒 40（simian virus 40，SV40）早期启动子；C，人巨细胞病毒（cytomegalovirus，CMV）立早基因启动子；HD，*hisD* 基因；H，潮霉素 B 磷酸转移酶（hygromycin-B-phosphotransferase，*hph*)；X，克隆位点。除了 LN，这个病毒载体包含两个启动子；一个驱动标记基因的表达，另一个调控插入 DNA 的表达。其他病毒载体中插入的 cDNA片段的转录是由强大的病毒启动子调控的——反转录病毒 LTR（LXSN、LXSHD 和 LXSH)，CMV 启动子或 SV40 启动子（LNSX)。一般来说，LTR 和 CMV 启动子在人类的细胞中是非常强大的启动子，而 SV40 启动子比较弱。包含三种不同显性选择标记中的任何一种的病毒载体在图中被标明。对任何一种标记的选择不依赖于其他标记的存与否，可以相继使用携带不同选择标记的病毒载体转移多个基因进入细胞。

材料（标√的条目参见附录 1）

二个反转录病毒包装细胞株：如 PE501 和 PAS 317

√完全的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基（Dulbecco’s modified Eagle medium，DMEM）包含 4.5g/L 葡萄糖和 10%（*V/V*）的胎牛血清 FBS（DMEM/10% FBS）

反转录病毒载体包含选择性标记

PBS 含 4mg/ml Polybrene（Sigma)（见附录 1 PBS 项）

针对选择标记的药物：如 0.75mg/ml G418（活化化合物)，4mmol/L 组氨醇，或 0.4 mg/ml 潮霉素 B

√细胞染色液

6cm 和 10cm 的组织培养皿

10ml 注射器

0.45μm 的低蛋白质结合的纤维素乙酸盐注射器式滤器

克隆形成环（单元 3.1）

1. 第 1 天，接种 5×10^5 个细胞/6cm 皿的 PE501 反转录病毒包装细胞于完全 DMEM/10% FBS 中，孵育 1d。

   需要二个不同的包装细胞株；第一个细胞株产生的病毒一定能够传染第二个细胞株，也就是，他们一定是不同的但可兼容的假包膜（表 12.4.3）。

2. 第 2 天，换 4ml 新鲜的组织培养基。用包含选择标记的反转录病毒载体质粒进行磷酸钙转染（支持方案 1）。孵育 1d。
3. 第 3 天，吸弃转染的 PE501 细胞的培养基再加 4ml 新鲜的完全 DMEM/10% FBS。对于每个转染的 PE501 细胞皿，接种 5×10^5 个细胞 /6cm 皿的 PA317 细胞于完全 DMEM/10% FBS 中，孵育 1d。
4. 第 4 天，给 PA317 细胞换培养基，培养基含 4μg/ml 的 Polybrene（储备溶液稀释 1000

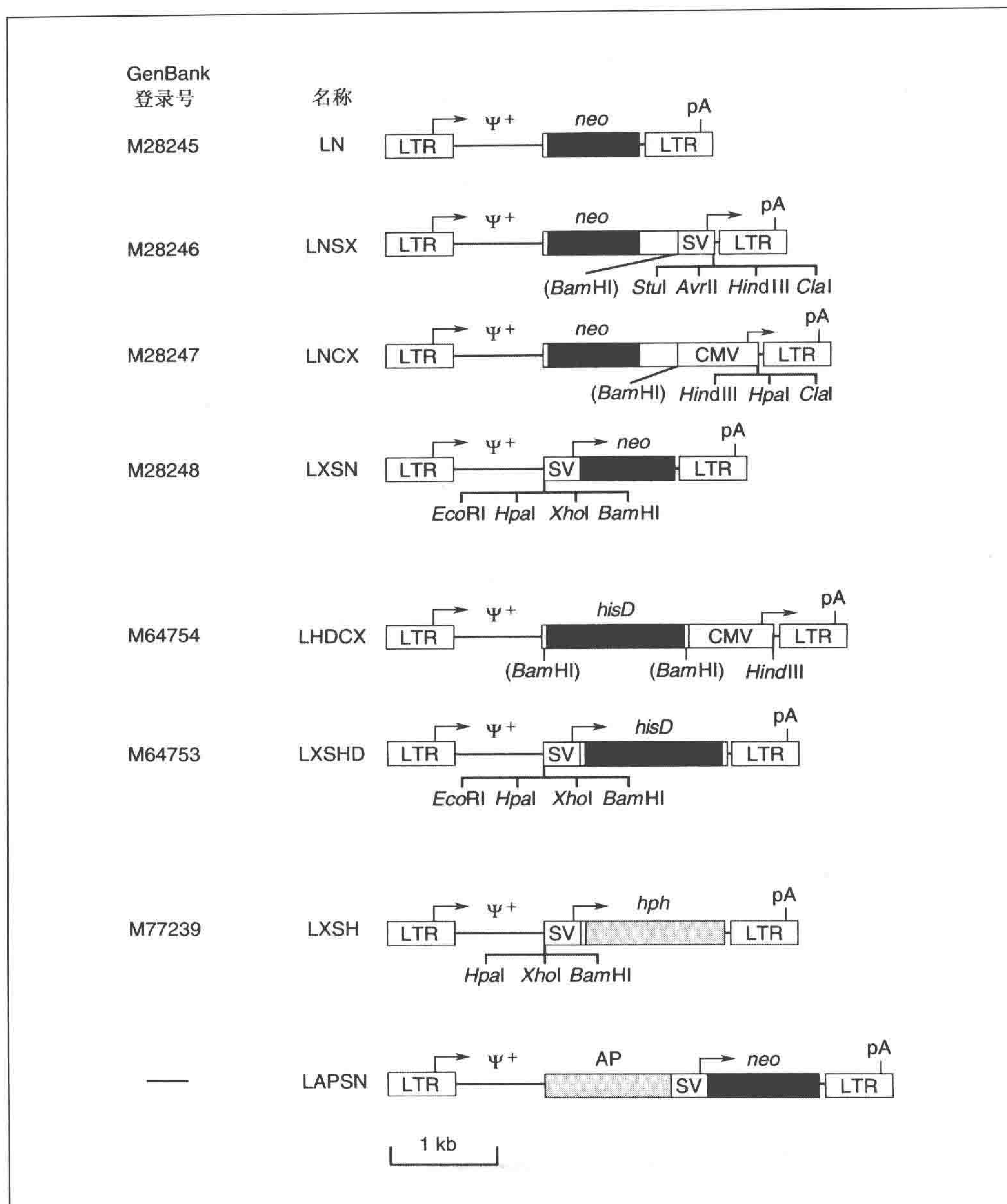


图 12.4.2　反转录病毒载体。包含药物选择标记的反转录病毒载体——新霉素磷酸转移酶（neomycin phosphotransferase，*neo*），组氨醇脱氢酶（histidinol dehydrogenase，*hisD*），或者潮霉素磷酸转移酶（hygromycin phosphotransferase，*hph*）——在图中列出了它们的 GenBank 登录号和完整的病毒载体序列。病毒载体名称是由病毒载体上基因元件的缩写组成。阴影部分表示基因的编码区。连接线表示其他病毒的序列，箭头表示启动子的加帽位点和转录方向。cDNA 插入的限制酶酶切位点已被标明。括弧里的限制酶酶切位点文本中有详述。携带 *neo* 和 *hisD* 的病毒载体已经被描述，LXSH 是用 *hph* 代替 LXSN 的 *neo* 改造的，LAPSN 已经被描述。缩写：C，人巨细胞病毒（cytomegalovirus，CMV）立早基因启动子；H，潮霉素 B 磷酸转移酶（hygromycin-B-phosphotransferase，*hph*）；HD，*hisD* 基因；L，长末端重复（long terminal repeat，LTR）；N，新霉素（neomycin，*neo*）基因；pA，多腺苷酸化信号（polyadenylation signals）；S，猿猴空泡病毒 40（simian virus 40，SV40）早期启动子；X，克隆位点；ψ^+，延长的反转录病毒包装信号。

倍）。

5. 使用 10ml 注射器，把 3ml 包含病毒的培养基从 转染的 PE501 细胞的每个皿移出，而且用 0.45μm 的低蛋白质结合的纤维素乙酸盐注射器式滤器过滤培养基除去活细胞。留 1ml 培养基在皿里使细胞不干死。
6. 用 1ml 过滤的来自一个转染的 PE501 细胞皿的包含病毒的培养基传染一个皿的 PA317 细胞，另一个皿用 10μl 来自相同的 PE501 皿的培养基。孵育 5d。
7. 胰蛋白酶消化 转染的 PE501 细胞并以每个皿 1∶20 的稀释度接种至 6cm 皿里，培养基包含针对选择标记的适当药物，比如 0.75mg/ml G418，4mmol 组氨醇，或 0.4mg/ml潮霉素 B。孵育 5d。
8. 用 1.5ml 细胞染色液染色 5min。用水洗去染色剂。计算集落形成率以估计 DNA 的转染效率（典型的转染效率是 1000 个集落/μg 质粒 DNA）
9. 转染 PA317 细胞后 1d（第 5 天），胰蛋白酶消化传染的 PA317 细胞并以每个皿 9∶10 和 1∶10 的稀释度接种至 10cm 皿里，用 10ml 包含适当药物的培养基（第 7 步）孵育 5～10d。
10. 药物抗性集落形成后，使用克隆环从皿里分离包含小量集落的克隆（约 10 个集落）（单元 3.1）。用包含筛选药物的培养基扩大培养以提供充足的细胞冻存和分析。
11. 当克隆细胞株被充分扩大培养后，每个克隆冻存一或两个玻璃小瓶备用以防止培养物筛选期间偶然遗失，即便是最好的病毒载体生产者。
12. 通过选择标记的转移测定病毒载体的滴度（支持方案 2）。
13. 鉴定那些抗药性克隆，目的细胞能在选择性培养基中生长，分析插入的 cDNA 的表达。
14. 抽提克隆的染色体 DNA（如附录 3A）。选择一种限制性内切核酸酶来消化 DNA，这种限制酶只在病毒的 LTR 区存在唯一的酶切位点，而在周围的染色体中任意切割。
15. 用 cDNA 探针 Southern blot 杂交分析被消化的 DNA（附录 3G）。
16. 用一个原病毒载体检测辅助病毒（支持方案 3）的产生并丢弃产生辅助病毒的任何克隆。
17. 一旦一个克隆细胞株被鉴定具有所需的特性，融解备用玻璃小瓶细胞之一（第 11 步），扩大培养，并冻结更多的细胞以备将来使用。

    大多数的克隆能持续产生病毒 2 个月以上，而且如果病毒滴度下降，融解一个新的玻璃小瓶来使用。

18. 为了要收获来自细胞的病毒，接种细胞在有 10ml 培养基的 10cm 组织培养皿中，培养到细胞汇合后 1d。换 10ml 新鲜的培养基，12 ～ 24h 后收获包含病毒的培养基，－70℃保存。

    病毒的半衰期在 37℃ 是 4h，因此，较长时间间隔做的收获是不可取的，因为有缺陷的病毒粒子可能在培养基中累积。至少，能连续地做三个 12h 后收获。大量的包含病毒载体的培养基能被冻存－70℃ 以备将来的使用。病毒载体原种应该被快速冻存和融解以保护病毒载体活性。

备选方案 1　没有选择标记产病毒稳定细胞株的制备

这个步骤中用 pSV2neo 作为选择标记质粒，但是其他有选择标记的质粒同样能很好地表达。PA317 包装细胞被用于这一个例子，但是其他的包装细胞株能被替换。

材料（标√的条目参见附录 1）

反转录病毒包装细胞（如 PA317，见表 12.4.1）

√含 4.5g/L 葡萄糖和 10% 的 FBS（V/V）的 DMEM（DMEM/10% FBS）

反转录病毒包装细胞（如 PA 317，见表 12.4.1）

反转录病毒载体质粒 DNA

有选择标记的质粒 DNA：如 pSV2neo

0.75mg/ml G418（活性药物）或其他针对选择标记质粒的选择药物

6cm 的细胞培养皿

克隆环（单元 3.1），无菌

1. 第 1 天，接种 5×10^5 个反转录病毒包装细胞 PA317 于含 4ml DMEM/10% FBS 的 6cm 细胞培养皿中。孵育 1d。
2. 第 2 天，换 4ml 新鲜的培养基。用磷酸钙转染法（支持方案 1），共转染 10μg 反转录病毒载体质粒 DNA 和 0.1μg 或 0.2μg pSV2neo 质粒 DNA。孵育 1d。
3. 第 3 天，吸弃转染 PA317 的培养基并加 4ml 新鲜的培养基。孵育 1d。
4. 第 4 天，胰蛋白酶消化 转染 细胞，再以 1：2～1：10 的稀释度接种到包含 750μg/ml G418 的培养基的 10cm 皿中。孵育 5～10d。
5. 使用克隆环（单元 3.1），分离包含小量集落的药物抗性克隆，扩大培养。
6. 当克隆细胞株充分扩大培养后，每个克隆冻存一或两个玻璃小瓶备用以防止培养物筛选期间偶然遗失，即便是最好的病毒载体生产者。
7. 如果可能，检测细胞株的病毒载体 cDNA 编码的蛋白质的产生。
8. 抽提克隆的染色体 DNA（附录 3A）。用限制性内切核酸酶消化和 Southern blot 杂交分析 DNA（附录 3G）。
9. 确定病毒载体效价。
10. 用标记补偿法检测辅助病毒（支持方案 3），扩大培养并收获病毒载体。（基本方案第 16～18 步）。

备选方案 2　短暂转染的病毒载体的制备

材料

反转录病毒包装细胞（表 12.4.1）和适当的细胞培养基

反转录病毒质粒 DNA

6cm 的细胞培养皿

10ml 注射器

0.45μm 的低蛋白质结合的纤维素乙酸盐注射器式滤器

1. 第 1 天，接种 5×10^5 个反转录病毒包装细胞于含 4ml DMEM/10% FBS 的 6cm 细胞培养皿中。孵育 1d。
2. 第 2 天，用磷酸钙转染法转染反转录病毒载体质粒 DNA 进入包装细胞（支持方案 1）。孵育 1d。
3. 第 3 天，换新鲜的培养基。孵育 1d。
4. 第 4 天，12～24h 后，使用一个 10ml 注射器，收获培养基并用 0.45μm 的低蛋白质结合的纤维素乙酸盐注射器式滤器过滤除去细胞和碎片。立刻使用包含病毒的培养基转染受体细胞或者－70℃储存。

支持方案 1　培养细胞的磷酸钙转染

注意：所有的溶液应该用 0.22μm 无菌过滤器过滤以灭菌；如果质粒 DNA 没有经过灭菌，因为它在制备期间是用乙醇沉淀的，它也应该被过滤。

材料（标√的条目参见附录 1）

反转录病毒质粒 DNA
√10mmol/L Tris·Cl，pH7.5
反转录病毒包装细胞（表 12.4.1）
√含 4.5g/L 葡萄糖和 10% 的 FBS（*V/V*）的 DMEM（DMEM/10% FBS）
√2.0mol/L $CaCl_2$
500mmol/L HEPES，pH 7.1
2.0mol/L NaCl
√150mmol/L 磷酸盐缓冲液，pH7.0
无菌 H_2O
12mm×75mm 干净的聚苯乙烯管（Falcon）

1. 用 10mmol/L pH7.5 的 Tris·Cl 重悬纯化的反转录病毒载体质粒 DNA，终浓度为 1μg/μl。
2. 转染前一天，接种 5×10^5 个反转录病毒包装细胞在含 DMEM/10% FBS 的 6cm 的细胞培养皿里。孵育 1d。
3. 用新鲜的培养基培养反转录病毒包装细胞。
4. 对于每个质粒，准备并混合 DNA/$CaCl_2$溶液：
   25μl 2.0mol/L $CaCl_2$；
   10μg 质粒 DNA 在 10mmol Tris·Cl 里，pH7.5；
   加无菌 H_2O 至 200μl。
5. 准备并混合新鲜的沉淀缓冲液：
   100μl 500mmol HEPES，pH7.1；
   125μl 2.0mol/L NaCl；
   10μl 150mmol 磷酸钠缓冲液，pH7.0；
   加无菌 H_2O 至 1ml。
6. 在干净的 12mm×75mm 聚苯乙烯管里，把 200μl DNA/$CaCl_2$溶液逐滴地加入 200μl

沉淀缓冲液中并持续搅拌。室温孵育 30min。可以观察到淡淡的云雾状混浊，如果重组物保持清亮或者有大的团块样混浊，用新鲜的 HEPES 重新准备一份新的沉淀溶液。

7. 检查管中的沉淀物是均匀的而不是成块的沉淀。把沉淀物加入一个含反转录病毒包装细胞的 6cm 皿并摇晃皿使其分布均匀。孵育并着手进行选择或者筛选细胞（基本方案或备选方案 2）。

支持方案 2　确定带选择标记的病毒载体的滴度

为不携带标记基因的病毒载体确定滴度更困难：确定这样的病毒载体的滴度可以做被转染细胞的 Southern blot 杂交（附录 3G），用被分析的病毒载体或者携带允许滴度直接被确定的选择标记的另一个可匹配的病毒载体。

材料（标√的条目参见附录 1）

对待检病毒载体的假包膜敏感的细胞（如 NIH 3T3 或 HeLa 细胞）和合适的细胞培养基
4mg/ml 聚凝胺（Sigma）
待检的反转录病毒载体原种（如基本方案或备选方案 1 或 2）
选择的药物：0.75mg/ml G418，0.4mmol 潮霉素 B，或 4mmol 组氨醇 D
√细胞染色溶液
6cm 的细胞培养皿

1. 第 1 天，接种 5×10^5 个对病毒载体假包膜敏感的靶细胞在含适当细胞培养基的 6cm 细胞培养皿中。孵育 1d。
2. 第 2 天，换含 4μg/ml 聚凝胺的培养基培养细胞，并加入不同数量的反转录病毒储存液（0.01～100μl）在不同的皿里。孵育 1d。
3. 第 3 天，胰蛋白酶消化并以 1∶20 的稀释度接种到包含适当浓度的药物的培养基里。孵育 5～8d。
4. 集落形成之后，用 1.5ml 细胞染色溶液染色 5min。用 H_2O 洗去染色剂和计数集落。计算病毒滴度。

病毒滴度用每毫升形成集落数表示（CFU/ml），是用集落的数目除以原体积（ml）即用来转染的是未稀释病毒原种，所以要乘以 20 以纠正 1∶20 细胞稀释度。

支持方案 3　辅助病毒的标记补偿检测

虽然这个检测略微沉闷而且较慢，但它很可靠并非常敏感。

材料

LAPSN 病毒载体（图 12.4.2）
对 LAPSN 假包膜敏感的反转录病毒包装细胞（表 12.4.1）和合适的细胞培养基
对病毒载体假包膜敏感的天然靶细胞：如 NIH 3T3 或 HeLa 细胞

待检的反转录病毒载体原种（基本方案或者备选方案 1 或 2），用 0.45μm 的低蛋白质结合的纤维素醋酸盐注射式滤器过滤

含 4mg/ml 聚凝胺（sigma）PBS（附录 1 PBS 项）

阳性对照病毒：双向性有复制能力的辅助病毒

6cm 的细胞培养皿

10ml 注射器

0.45μm 的低蛋白质结合的纤维素醋酸盐注射器式滤器

1. 制备含 LAPSN 病毒载体（图 12.4.2）的病毒原种，可以来自短暂转染的反转录病毒包装细胞（备选方案 2）或者来自稳定的产生病毒载体的细胞株（基本方案或备选方案 1），LAPSN 病毒载体可以编码碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，AP）。
2. 用病毒转染天然的靶细胞。传代细胞 2 个星期允许辅助病毒（不应该存在）繁殖。
3. 通过传染不包含病毒载体的亲代细胞为病毒载体制备化验细胞。

   分装那些不释放反转录病毒载体的细胞（非产病毒细胞），它们应该储存在液氮中以备将来的标记补偿使用。非产病毒细胞需要一次产生。

4. 第 1 天，接种 5×10^5 个包含 LAPSN 的非产病毒细胞在含适当培养基的 6cm 细胞培养皿中。孵育 1d。
5. 第 2 天，通过加 1ml 过滤的待检反转录病毒原种，3ml 细胞培养基和 4μg/ml 聚凝胺，传染非产病毒细胞。用少量的有双向复制能力的辅助病毒传染一些皿作为阳性对照。
6. 从第 3 天起，孵育细胞 2 周允许辅助病毒繁殖。一周 2 或 3 次，用胰蛋白酶消化细胞再以 1∶10～1∶40 接种。保持细胞相对高地密度。
7. 第 16 天，以 10^5 个细胞每 6cm 皿接种对病毒载体假包膜敏感的天然靶细胞（与非产病毒细胞株同种的细胞）。同时，更换长满的非产病毒细胞的培养基。孵育 1d。
8. 第 17 天，收获来自非产病毒细胞的培养基和用 0.45μm 低蛋白质结合的注射式过滤器除去细胞和碎片。
9. 用 1ml 含样品的培养基，3ml 细胞培养基和 4μg/ml 聚凝胺，传染天然的靶细胞。孵育 1d。
10. 第 19 天，染色受传染的靶细胞做碱性磷酸酶活性分析（支持方案 4）。

    染色反应阳性提示来自非产病毒细胞的病毒的感染，由于反转录病毒原种中辅助病毒的存在。

支持方案 4　染色法检测培养细胞的碱性磷酸酶活性

这一方案是针对 6cm 皿培养细胞的，但是容易对其他尺寸的皿调整条件。

材料（标√的条目参见附录 1）

转染了编码碱性磷酸酶的病毒载体的细胞培养物（如 LAPSN）在 6cm 的细胞培养皿中

0.25%（V/V）戊二醛/PBS

√PBS

√碱性磷酸酶染色缓冲液

√碱性磷酸酶染色液

1. 吸弃转染编码碱性磷酸酶的病毒载体的细胞培养物的培养基。室温用3ml 0.25%的戊二醛固定细胞5～10min。使用不转染细胞做为阴性对照和转染已知的产生碱性磷酸酶的细胞做为阳性对照。
2. 用2～3ml PBS洗细胞两次。加2ml PBS 65℃ 加热30min使细胞的碱性磷酸酶失活 。
3. 皿冷却后，吸弃PBS并用2ml碱性磷酸酶染色缓冲液洗一次，除去磷酸盐。
4. 加1.5ml碱性磷酸酶染色液。室温孵育4h（依赖细胞类型和背景碱性磷酸酶活性）。
5. 计算碱性磷酸酶阳性细胞。

参考文献：Cosset *et al.*, 1995；Danos and Mulligan，1988；Dougherty *et al.*, 1989；Miller，1990

编者：A. Dusty Miller

单元12.5 假包膜型反转录病毒载体的制备

反转录病毒假包膜的定义是一个病毒的基因组被第二个病毒的包膜蛋白壳体化。假包膜的宿主范围是由产生包膜蛋白的病毒决定的。正因为依赖于包膜蛋白，因此，假包膜形成既能伸展也能或限制亲本反转录病毒的宿主范围。

为了产生VSV-G的假包膜反转录病毒载体，稳定表达MLV gag（编码核心蛋白）、pol（编码反转录酶）和VSV-G蛋白的包装细胞株必须被建立。因为VSV-G对大部分哺乳动物细胞是有毒性的，生产VSV-G假包膜反转录病毒载体的替代步骤已经被建立。

注：所有与细胞接触的溶液和用具必须灭菌，相应的使用合适的灭菌技术。

注：除非特殊说明，所有培养物培养37℃，10% CO_2 饱和湿度的培养箱里。

基本方案 短暂转染的假包膜反转录病毒的制备

这一个方案中，选择标记是编码大肠杆菌新霉素的*neo*基因，筛选药物是G418（关于这个选择标记的细节见单元3.1）。基本方案允许在1个星期内小量快速的制备高滴度的假包膜反转录病毒载体。

材料（标√的条目参见附录1）

反转录病毒载体用CMV IE启动子代替5′U3区

293GP和NIH3T3细胞的培养物

√DMEM/10% FBS

质粒pCMV-G

√TE79/10

√2mol/L CaCl

√2×HeBS
√0.1×HBS
√4mg/ml 聚凝胺
√40mg/ml G418
100% 甲醇
0.04%（*m*/*V*）吉姆萨染色液
Beckman polyallomer（聚丙烯和聚乙烯的聚合物，PA）高速密封离心管
vTi 50 转子
高速的超速离心机
100mm 细胞培养皿
6ml 聚丙烯管，无菌
0.45μm 的灭菌无热原的注射器式滤器
14mm×89mm Beckman 超干净的离心管，紫外灭菌过夜的层流通风橱
SW41 转子
能经受高压热气作用的宽嘴离心瓶（Nalgene）
超速离心机（Sorvall）
GSA 转子

1. 克隆（单元 12.4）目的基因进入修饰的反转录病毒载体如图 12.5.1 所示，用 CMV IE 启动子代替 5′ LTR 的 U3 区。

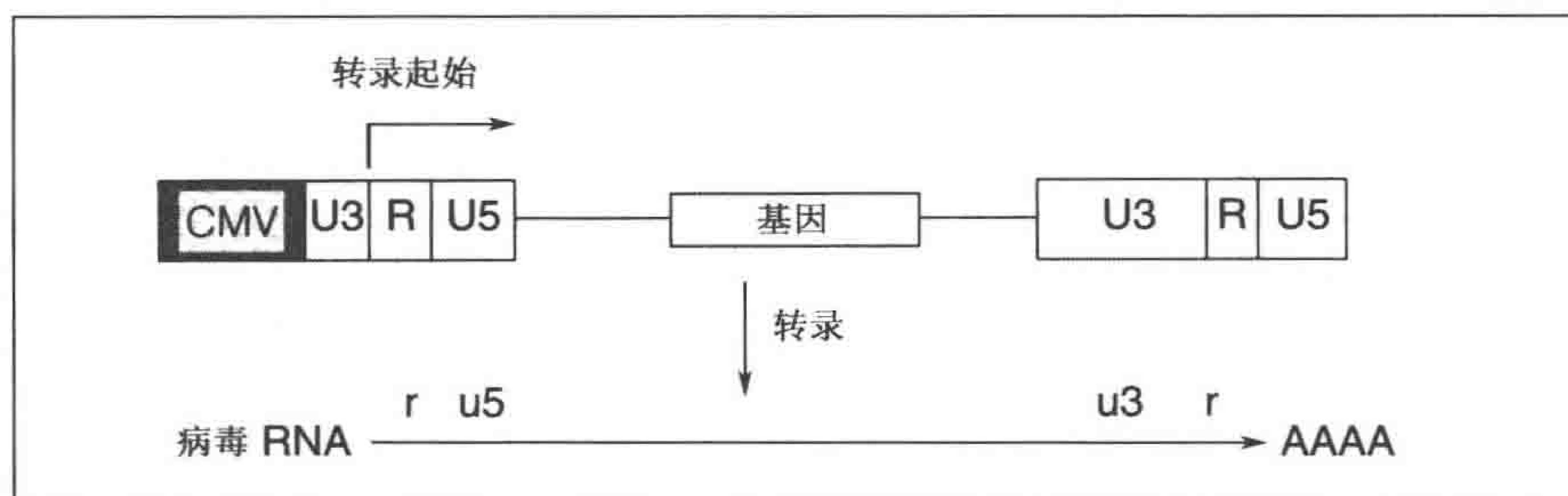


图 12.5.1　包含 LTR（顶端）和它的 RNA 转录子（底部）的反转录病毒载体的示意图。5′LTR 的大部分 U3 区域被 CMV IE 启动子代替。因为重组 CMV-LTR 的 R 和 U5 区域保持不变，重组 CMV-LTR 的转录起始位置与野生型 LTR 的一样。在重组 LTR 上面的箭头指出转录起始位置和转录方向。

2. 用 Beckman polyallomer（聚丙烯和聚乙烯的聚合物）高速密封离心管和 vTi 50 转子的超速离心机，氯化铯法提纯包含目的基因的病毒载体后，再用碱裂解法纯化。
3. 转染之前的 24h，接种 1×10^6 293GP 细胞于 10ml 完全 DMEM/10% FBS 的 100mm 细胞培养皿中。孵育。
4. 转染当天，在灭菌的 6ml 的聚丙烯管里混合 20μg 氯化铯纯化的病毒载体 DNA 和 20μg pCMV-G，它包含 CMV IE 启动子控制的 VSV-G 基因。用 TE79/10 调整体积到 437μl。
5. 加 63μl 2mol/L $CaCl_2$ 并混匀，然后加 500μl 2×HeBS 并持续搅拌。

6. 室温静置 30min 使形成磷酸钙-DNA 沉淀物。把沉淀物加入 293GP 细胞至少达到 50% 汇合度的细培养皿（70%～80% 是理想的，细胞密度对病毒制备是至关紧要的），孵育 8h 。
7. 以 6ml 新鲜的 DMEM/10% FBS 换液并持续孵育。
8. 在转染后的 24～96h，收集培养基上清液，使用灭菌的 0.45μm 注射式过滤器过滤，并于 −70℃ 储存。

   因为 VSV-G 的过量表达，在转染后 48h 出现明显的大量细胞死亡并从细胞培养皿上脱落。然而在细胞死亡变成明显之前，在转染后 24h，可能收获高滴度的病毒。细胞上清液能被持续收集直到黏附在皿上的转染细胞<30%。为了要更进一步增加病毒产量，细胞上清液能每间隔 4h 收集一次，达到一天 3 次。然而重要的是在病毒收集和细胞换液期间不扰乱那些黏附不好的 293GP 细胞。转染细胞的脱离将会造成大量的细胞损失。

对于假包膜反转录病毒载体的小量（<100ml）收集

9a. 在 37℃融解冻存的病毒，转移到 14mm×89mm 的在层流通风橱紫外线灭菌过夜的 Beckman 超净离心管里。以 50 000*g*，4℃离心 90min。
10a. 在层流通风橱弃去细胞上清液。用 0.5%～1% 最初体积的 DMEM/10%FBS 或 0.1×HBSS 重悬病毒颗粒，4℃。温和的用吸移管分散病毒聚集物。孵育过夜。
11a. 分装病毒，−70℃保存（通常有传染性的病毒<50%复苏的）。为进一步提高病毒滴度，进行第二个超速离心步骤（已经被证实滴度可高达 10^9 cfu/ml）。

对于假包膜反转录病毒载体的大量收集

9b. 在 37℃ 融解冻存的病毒，转移到灭菌的 250ml 宽嘴离心瓶。4℃ ，13 000*g*（9000r/min 用 GSA 转子）离心 15h 以沉淀病毒。
10b. 4℃重悬病毒颗粒。温和的用吸移管分散病毒聚集物。孵育 4h。
11b. 分装病毒，−70℃保存（通常有传染性的病毒是复苏的 20%～40%）。
12. 转染前 24h，每 100mm 细胞培养皿 2×10^5 的密度接种鼠 NIH3T3 细胞在 DMEM/10%FBS 中。
13. 0.1、1 和 10μl 收获的病毒传染细胞在含 4μg/ml 聚凝胺培养基中。孵育过夜。
14. 换新鲜的 DMEM/10% FBS 培养基并加 800μg/ml 的 G418。每 3d 重复 1 次。
15. 感染后两个星期，100% 甲醇固定 G418 抗性克隆 10min，0.04% 吉姆萨染色液染色 10min，计数。用 G418 抗性克隆的数目乘以对应稀释倍数确定未稀释病毒原种的滴度，表示成 cfu/ml。

备选方案　来自稳定包装细胞的假包膜反转录病毒的制备

这个方案对假包膜反转录病毒载体的大量制备是有用的。

附加材料（基本方案；标√的条目参见附录 1）

双向性包装细胞株 PA317 的培养物
包含目的基因和 *neo* 基因的反转录病毒载体
√80mg/ml 潮霉素

√1mg/ml 嘌呤霉素
√1mg/ml 四环素
√200μmol/L 的 β 雌二醇
6 孔和 24 孔细胞培养板

1. 转染前 24h，按每 100mm 细胞培养皿 1×10^6 的密度接种 PA317 细胞在 DMEM/10% FBS 中。孵育。
2. 转染细胞用 20μg 包含目的基因和 *neo* 选择基因的反转录病毒 DNA（基本的方案，第 4～7 步）。
3. 转染后 48h，收获病毒，0.45μm 注射式过滤器过滤，并于－70℃保存。

   从 PA317 细胞短暂转染产生的病毒载体滴度取决于反转录病毒的结构，10^2～10^3 cfu/ml。

4. 反转录病毒感染前 24h，按每 100mm 细胞培养皿 2×10^5 的密度接种 293GP/G-21 细胞在 DMEM/10%FBS 中，加 800mg/ml 的潮霉素，1mg/ml 的嘌呤霉素和 2mg/ml 的四环素。
5. 用第 3 步收获的双向性病毒传染第 4 步描述的 293GP/G-21 细胞，加 4mg/ml 聚凝胺在培养基中。感染后 24h，用第 4 步描述的培养基加 800mg/ml G418 给细胞换液。
6. 每 3d 用第 4 步描述的培养基加 800mg/ml G418 给细胞换液。
7. 筛选两周后，用自动移液器挑 G418 抗性克隆接种接到 24 孔细胞培养板，然后从 24 孔接种到 6 孔细胞培养板，再然后是 100mm 细胞培养皿如果需要的话。
8. 为了识别高滴度的病毒产生克隆，诱导病毒产生前 24h，按每 100mm 细胞培养皿 2×10^6 的密度接种这些细胞在 DMEM/10%FBS 中，加 800mg/ml 的潮霉素，1mg/ml 的嘌呤霉素，800mg/ml G418 和 2mg/ml 的四环素。
9. 诱导的当天，用 10ml DMEM/10% FBS 换液。为了要除去残余的四环素，37℃至少孵育细胞 30min 并再一次用新鲜的 DMEM/10% FBS 换液。重复这一步骤三次。
10. 为了要诱导病毒产生，把 2mmol/L 的浓度 β-雌二醇加入 10ml DMEM/10% FBS。
11. 加 β-雌二醇后 72h，收获病毒培养物上清，0.45μm 注射式过滤器过滤。确定 NIH3T3细胞病毒滴度（基本方案，第 12～15 步）。
12. 一旦高滴度生产克隆被分离，接种，洗并诱导如第 8～10 步所描述的，生产细胞将大量产生病毒。β-雌脂二醇诱导后 48h，可以一天三次收集病毒培养物上清液，持续达两周并可超速离心收集的培养基以进一步浓缩病毒（基本方案，第 9a～11a 或 9b～11b 步）。

   被诱导的细胞可连续生产高滴度病毒（10^5～10^6 cfn/ml）达两周。

参考文献：Chen *et al.*，1996b；Miyanohara *et al.*，1995；Yee *et al.*，1994
编者：Jiing-Kuan Yee

单元 12.6 高滴定度慢病毒载体产物

对比致瘤反转录病毒，慢病毒同人免疫缺乏病毒（HIV）属于反转录病毒家族，能

感染生长停止和正在分化细胞。相应地，反转录病毒载体能在组织培养基和体内有效转导非复制细胞。

产生的载体群种，将强制性地避免复制竞争性复合物发生。在反转录病毒的基因组中，一条 RNA 分子同样由关键的顺式作用元件携带所有的编码序列。载体产物系统的生物安全性取决于编码序列的所有组件，为扩大重组事件的发生将需要一个竞争复制性病毒。

本单元用到的质粒如图 12.6.1 所描述。pMDLg/pRRE 编码 HIV-1 和 Gag/Pol 蛋白。pMD. G 质粒提供 VSV G 外膜蛋白。pRSVrev 质粒编码 HIV-1 Rev 蛋白。最后，pRRL-CMV-GFP-sin 编码载体 RNA 分子被包装到颗粒中。在这个载体中，CMV 启动子和编码绿色荧光蛋白（GFP）的序列可被其他转录盒和基因替代。更重要的是，这 4 个质粒都被设计为缺失重复序列以最小化重组。更多序列细节可登陆网址：http://www.tronolab.unige.ch/x _ home2.htm. 这个网页也能回答这个单元中出现的质粒的

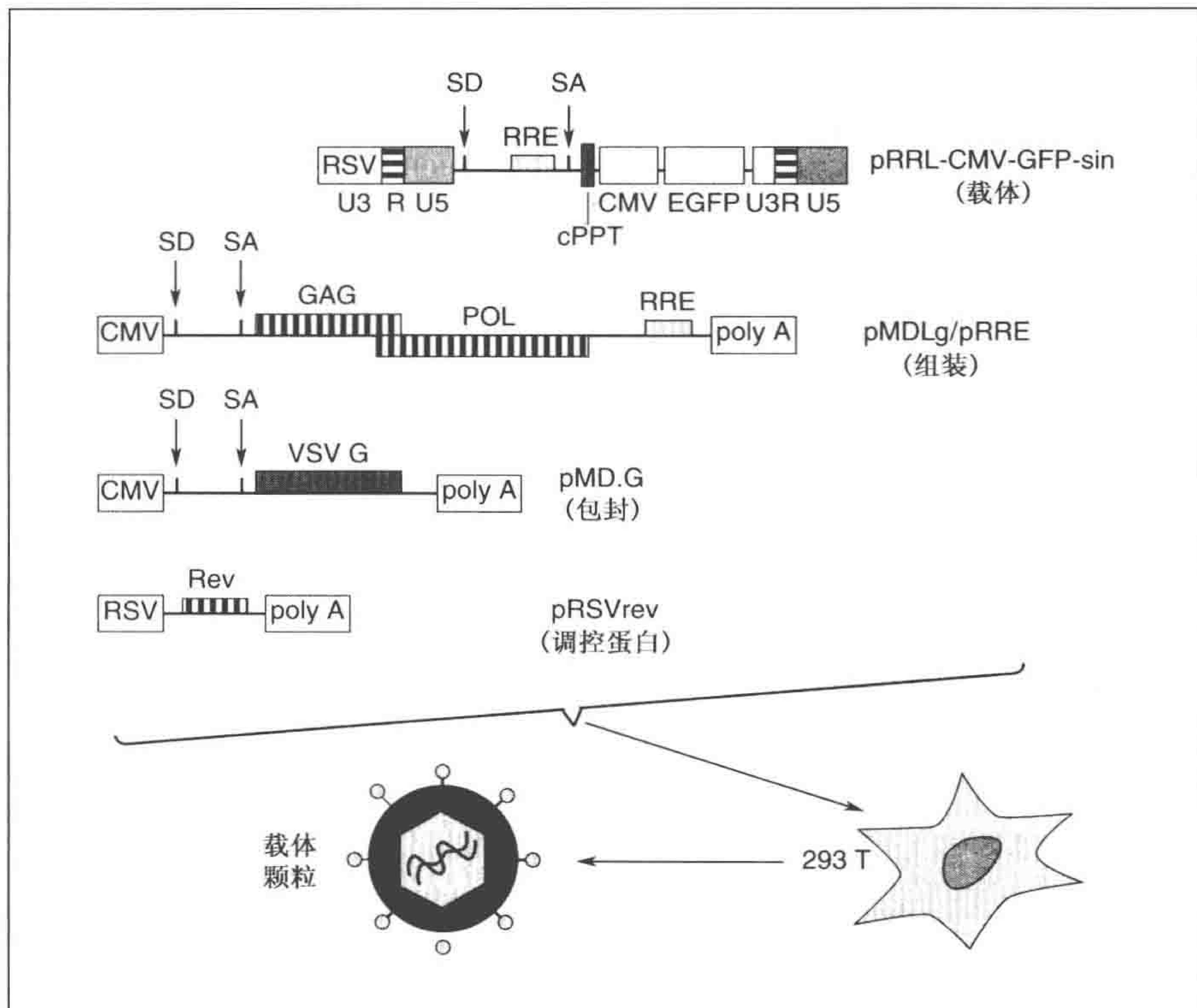


图 12.6.1　HIV 载体制作过程：图示描述了 HIV 载体制作的过程。用 4 种质粒转染 293T 细胞以得到 HIV 载体，该质粒的特性如图。载体质粒（顶端）的特点是 5′端有 RSV/HIV 嵌合 LTR，而 3′端 LTR 部分短缺。HIV-1 的 Gag 和 Pol 蛋白，以及 VSV 的 G 蛋白分别由两个独立的质粒编码（自上数第二和第三个）。第四个质粒（底端的）编码对 Gag/Pol 蛋白表达和载体构建必需的 Rev 转录后调控子。缩写：CMV，从人的细胞巨化病毒得到的及时启动子；cPPT，中央多嘌呤束；PolyA，多腺苷酸信号；RRE，Rev 作用元件；RSV，自 Rous Sarcoma 病毒得到的 U3 区域（启动子）；SD 和 SA，分别为拼接供体和受体位点；sin，自激活。

相关问题。

注意：VSV G-假膜标本慢病毒载体在体内和体外都有广大的趋向性；转基因的生物安全性需要考虑。要求 BL2 实验室。慢病毒载体的运用将被地方生物安全委员会监控。详见单元 12.1 基因治疗载体的生物安全概述。

注：所有用于活细胞实验的试剂和设备都需要无菌，仪器的使用要严格遵照说明进行。

基本方案　高滴定度 HIV-1 基本载体转染 293T 细胞实验步骤

材料（标√的条目参见附录 1）

293T 细胞（实验所用的 293T 细胞信息详见 http://www.tronolab.unige.ch）
杜氏改良培养基/10%FBS（DMEM-10）
pMD. G（编码 VSV G 外膜蛋白）
pRRL-CMV-GFP-sin（载体）
pMDLgag/polRRE（编码 HIV-1 Gag 和 Pol 蛋白）
pRSVrev（编码 HIV-1Rev 蛋白）
√TE 缓冲液，pH8.0
√0.5mol/L $CaCl_2$
√2×HeBS
70%乙醇喷壶
√PBS，pH7.4
14%（V/V）漂白剂
10cm 组织培养皿
37℃培养箱，10%和 5%CO_2
0.5ml 和 1.5ml 灭菌离心管
15ml 和 50ml 灭菌离心管
125ml 过滤器，0.45μm 滤纸口径
75cm² 组织培养瓶
30ml（25mm×89mm）和 5ml（13mm×51mm）灭菌异质同晶聚合物离心管（Beckman）
超速离心机带 SW28 型和 SW55 型转头（Beckman）

1. 在 10cm 组织培养皿中用 DMEM-10 培养基培养 293T 细胞，37℃培养箱 10% CO_2 培养，每周 3 次传代 1∶4～1∶6（如每个星期一、三、五）。
2. 转染前 2 天，准备 10 个皿，每个皿中接种 2×10^6 个 293T 细胞，37℃培养箱 10% CO_2 培养过夜，隔天早上将细胞 1∶2 传代成 20 个 10cm 的培养皿中，加 10ml DMEM-10 培养基培养，再 37℃培养箱 10% CO_2 培养过夜。
3. 用 pH8.0 的 TE 缓冲液调整所有质粒 DNA（如 pMD. G、pRRL-CMV-GFP-sin、pMDLgag/polRRE、pRSVrev）浓度成 1mg/ml。
4. 将 100μl pMD. G、400μl pRRL-CMV-GFP-sin、240μl pMDLgag/polRRE 和 60μl

pRSVrev 混合于 1.5ml 离心管中。

这些量需要 20 个皿。每个皿需要 5μg pMD. G，20μg pRRL-CMV-GFP-sin，12μg pMDLg/pRRE 和 3μg pRSVrev。

5. 下午进行转染，加 210μl 去离子水到一次性 1.5ml 离心管中，共 20 个。再加 40μl DNA 混合物打匀。
6. 加 250μl 0.5mol/L 的 $CaCl_2$ 到第 5 步中的离心中混匀。
7. 加 250μl 2×HeBS 到 20 个 15ml 灭菌锥形离心管中，然后逐滴加入第 6 步中的 500μl DNA/ $CaCl_2$ 混合物到离心管中，充分混匀。
8. 将制备的溶液室温放置 30min。
9. 逐滴加第 8 步中的溶液到 20 个第 2 步中的培养皿中。轻轻混匀直到培养基呈现均匀的红色。
10. 将培养皿放置于 5%CO_2 培养箱中 37℃过夜。隔天早上用 10ml 新鲜 DMEM-10 换液后，37℃培养 28h。
11. 收集上清液到 50ml 离心管中盖上盖子，用 70%乙醇消毒后带出无菌罩。4℃，500*g* 离心 2min。
12. 连接 125ml 过滤器到真空泵，过滤 100ml 培养基通过 0.45μm 的滤膜。用另外一个过滤器过滤剩下的 100ml 培养基。将过滤的溶液置于 75cm^2 组织培养瓶中。
13. 可选操作：取 1ml 于 1.5ml 离心管中（支持方案 1 和 2），于 4℃保存备用。

滴定是随机的，当<10^8 TU/ml 的时候最终滴定度很重要。这种情况下，就需要确定步骤中的哪步没有达到最佳。第 13 步中的样品滴定度决定载体产品是否可用。离心后滴定度<10^6 TU/ml 或回收率<50%都存在问题。比较第 13 和 18 步中的载体颗粒数目（由计算第一次离心后得到回收率得出），在离心前计算颗粒回收率和颗粒数目。颗粒数目是滴定度（TU/ml）乘悬液体积（ml），详见表 12.6.1。

表 12.6.1 典型的载体复苏纯化步骤

样品	方法步骤	滴度/(TU/ml)	体积(ml)	颗粒数	复苏/%
粗储存	13	10^6	180	1.8×10^8	N. A.
中等储存	18	2×10^7	5	10^8	55
最终储存	21	2×10^9	0.2	0.4×10^8	40

VSV G-假模标本慢病毒 37℃半衰期为 24h，载体保存要先在 4℃放置 24h，然后−80℃长期保存。

14. 转移过滤的培养基到 6 个 30ml 的灭菌异质同晶聚合物离心管中，将离心管放于 SW28 转子中，盖上超速离心机槽后带出无菌罩。16℃，72 100*g* 离心 90min。
15. 打开高速离心机的罩子。用镊子小心将管子取出离心机。倒置管子以把上清液移入一 75cm^2 的组织培养瓶中。留少许上清液用来滴定（离心前病毒颗粒<5%的应存留在上清液中）。在残留的上清中加入 1/6 体积的 14%漂白剂，混匀，静置 1h，去除。保持管子倒置，并用纸巾拭净管壁，以尽量除尽上清液。用镊子夹取纸巾。不要擦到管子的锥形底部。把空管子置冰上。加 600μl 的 PBS。
16. 用 1ml 的 tip 吹打 20 次以重悬载体沉淀，勿打起泡沫。置冰上 30min。

17. 再吹打 20 次。将 6 管中的重悬载体颗粒共同放入一个 5ml 离心管中。加入适量 PBS 以充满管子。

    一轮离心即可为体外实验提供足够高的浓度。这样，载体颗粒被集中，分装入 0.5ml 离心管，保存在−80℃。

18. 用 195μl DMEM-10 稀释 5μl 载体重悬液。将其保存在 4℃直至用来滴定（支持方案 1 和 2）。
19. 76 000g，16℃高速离心 90min。打开离心机罩子。用镊子取出管子，在一 50ml 离心管上倒置管子以去除上清液。留少许上清液用来滴定（离心前病毒颗粒<5%的应存留在上清液中）。在残留的上清液中加入 1/6 体积的 14%漂白剂，混匀，静置 1h，去除。擦拭管子（第 15 步）。在管底加 210μl 的 PBS。
20. 用 1ml 的 tip 吹打 20 次以重悬载体沉淀，冰上孵育 2h。重复吹打以完成重悬。
21. 用 495μl DMEM-10 稀释 5μl 浓缩后的载体块。用 400μl DMEM-10 和 100μl 第一次的稀释液混匀。将这些 1∶100 和 1∶500 稀释的悬液保存在 4℃以备用来滴定（支持方案 1 和 2）。用第 13、18 和 21 步保存的液体计算复苏百分比（表 12.6.1 是病毒纯化过程的典型结果）。
22. 将第 21 步获得的浓缩液分 10 管，20μl/管。−80℃储存。

支持方案 1　滴定慢病毒 GFP 载体株

慢病毒载体的滴定程序很像其他载体（单元 12.7 和 12.8 疱疹载体及单元 12.3 腺相关病毒载体的滴定程序）。有几个参数可以影响载体表现出的滴定度，如用于靶细胞的细胞系、加入载体颗粒的培养基的体积、转染的持续时间以及有没有能帮助载体颗粒附着于细胞表面的多聚阳离子。此程序可用于任何细胞系。但是，有的细胞系转染效果较差，而且这里标示的适用于 HeLa 细胞的预期结果并不适用于所有细胞系。最好用 293T 细胞替代 HeLa 细胞，因为这种细胞系在实验室培养就是专门用来做细胞转染的。然而，就算 293T 细胞象 HeLa 细胞一样转染效率高，它们的贴壁能力却较差。当然，这不是 GFP 检测的问题（支持方案 1），而是 *LacZ* 染色过程中应该特别注意的（支持方案 2）。不论如何，如果用 293T 细胞，在加入每种试剂时都必须特别小心地轻轻吹打。

附加材料（基本方案）

HeLa 细胞（ATCC＃CCL-2）
载体（基本方案）
0.25%胰酶/0.53mmol/L EDTA（无染料；Life Technologies；商业化 10×株 PBS 稀释）
6 孔组织培养板
荧光细胞分析仪（FACS；Becton Dickinson）及适用的管子

1. 滴定前一天，在每个 6 孔板的孔中，用 2ml DMEM-10 准确接种 0.5×10^5 数量的 HeLa 细胞，并保证细胞平均分布于孔板底部。每种载体株准备一个孔板做滴定用。37℃，10% CO_2 孵育过夜。

2. 在 5 个孔内，加入等量待滴定的载体液：用 50μl 和 25μl 未稀释的液，及 100μl、50μl 和 25μl 按 1∶50 稀释的液（分别对应 2.0μl、1.0μl、0.5μl 的未稀释液）。勿在另一孔内转染细胞，做空白对照。
3. 在 FACS 分析前，去除培养基，用 2ml PBS 洗一次，加入 500μl 无色胰酶/0.53mmol/L EDTA。孵育 5min 以消化细胞。用 1ml tip 吹打以打裂凝块。将细胞转至装有 500μl PBS 的 FACS 管子里。

   如需要，可将一份细胞保持于培养状态。如 FACS 分析在 1h 内未完成，可以用 4%（*m/V*）多聚甲醛溶液（见配方）固定细胞 30min，能在 4℃保存至少一周。
4. 通过 FACS 分析确定 GFP 阳性细胞比例。
5. 以下面公式计算滴定度，单位为转化单位（TU）/ml：

$$\frac{(1\times10^{5}\ \text{接种细胞}\times\%\text{GFP 阳性细胞})\times1000}{\text{载体}\ \mu\text{l}\ \text{数}}$$

   为了做精确的滴定计算，2 个连续稀释液在两周内转染后的 GFP 阳性细胞数比值必须接近 1∶2 的预期值。当＜15%的靶细胞转化后，此线性化结果能被观察到。

支持方案 2　滴定慢病毒 *LacZ* 载体株

含 *LacZ* 的载体（如 http://www.tronolab.unige.ch 一些列表中的）最好是用检测 β-半乳糖苷酶的免疫化学方法滴定。标准 96 孔板很好用，因为在 40 倍放大的显微镜下，整个孔都清晰可见。细胞 24h 内增多 1 倍，则多数转化情况都是出现 2～4 个蓝色细胞簇。单个蓝色簇很少，但是也有。蓝色细胞簇的数目必须要很少，以助于鉴定单个蓝色细胞簇是单个转化事件的结果。有 10～100 个蓝色斑点的孔可以计数转化事件。

附加材料（基本方案；标√的条目参见附录 1）

　HeLa 细胞（ATCC＃CCL-2）
　载体（基本方案）
√4%（*m/V*）多聚甲醛溶液
√Xgal 染色溶液
　96 孔组织培养板
　37℃，10% CO_2 增湿培养箱
　多级移液器和 tip
　倒置显微镜

1. 滴定前一天，在每个 96 孔板的孔中，用 200μl DMEM-10 准确接种 5000 数量的 HeLa细胞，并保证细胞平均分布于孔板底部。37℃，10% CO_2 孵育过夜。每个滴定都重复操作，做平行对照。
2. 在第二个纵列的孔里，加入用 198μl DMEM-10 稀释好的 2μl 载体液（共 400μl），第一列的孔做空白对照。
3. 用排枪做一系列的梯度稀释，从第二列孔开始取 200μl 液体打入下一列，然后补足 400μl，依次稀释下去之至倒数第二列。每次都用枪吹打均匀。37℃孵育 2d。
4. 检测 *LacZ* 阳性，去除培养基，用 400μl PBS 洗一次，用 250μl 4%多聚甲醛溶液准

确固定 5min，用 PBS 洗两次，加入 250μl Xgal 染色液。37℃孵育，定期查看。

5. 用 250μl PBS 替换 Xgal。如果必要，在 4℃保存至少一周。
6. 在倒置显微镜下，在含有 10～100 个蓝色斑点的 2 个孔里计数转化事件。参考稀释因素区分转化事件，并乘 100 倍来求算滴定度（TU/ml）。

参考文献：Cisterni *et al.*，2000；Deglon *et al.*，2000

编者：Romain Zufferey and Didier Trono

单元 12.7 构建复制缺陷型疱疹单纯病毒载体

作者已经有办法检测 HSV-1 IE 基因功能并继而通过同源重组把外源基因引入 HSV-1 基因组。由于有些 HSV-1 IE 基因——转染细胞蛋白 4（*ICP4*）和 27（*ICP27*）——对所培养细胞的生长是很必要的，反向表达这些基因产物以补足细胞系对于分离和繁殖复制缺陷型病毒突变体是很有必要的。

欲了解关于利用 virus-free HSV-1 复制子载体进行基因转移的信息，请参看单元 12.8。

安全提示：放射性、生物和化学物质需要特殊操作。另外，涉及病毒的所有操作都应该在生物安全环境下进行，并且要用专用的培养箱，不能和组织培养的混用。

注意：所有和细胞接触的溶液和设备都要用适合的方式灭菌。

注意：除特殊提示外，所有的培养环境都为 37℃、5% CO_2 增湿培养箱。

注意：当分离和处理 RNA 时，要戴手套，要尽量保持溶液冷、样品放在冰上，用新的无菌或 DEPC 处理过的离心管和 tip。

基本方案 1 构建 HSV-1 IE 基因补足型细胞系

由于疱疹单纯病毒（HSV）的即时（immediate early，IE）基因对病毒的毒性有贡献，因此必须在序列水平上从病毒载体的基因组去除这些细胞毒性基因。为了使缺失型病毒和插入补足型细胞系的 HSV-1 基因发生同源重组的概率降到最低，这个流程中涉及的构建补足型细胞系质粒必须用一种方法来构建，这种方法含有未和缺失型病毒进行同源重组的 IE 基因。同样，缺失型病毒和补足型细胞系也可能发生非同源重组，虽然概率极低（$<10^{-12}$）。

许多病毒 IE 基因的产物有细胞毒性，所以，人们渴望建立仅在细胞被转染后表达补足基因的补足型细胞系。

在建立补足型细胞系的过程中，分别编码 HSV-1 IE 基因或筛选标记基因（新霉素磷酸转移酶Ⅱ或普罗霉素 *N*-乙酰转移酶）的质粒都会用的上。或者，HSV-1 IE 基因可以被克隆进编码筛选标记的质粒，以增加获得既表达 HSV-1 IE 基因功能，又有抗性克隆的概率。当要构建一种细胞系，同时表达两种补足的 HSV-1 IE 基因，药物抗性基因应克隆到这两个基因中间，以获得更多通过抗性药物筛选的，又同时表达两种基因的克隆。

材料（标√的条目参见附录1）

Vero细胞（非洲绿猴肾脏细胞；ATCC＃CCC81）或其他适当的细胞系
胰酶/EDTA：0.05％（*m/V*）胰酶/0.3mmol/L EDTA（Life Technologies）
√完全MEM培养基有/无10％（*V/V*）FBS（完全MEM/10％ FBS和完全MEM）
胶纯化质粒DNA片段
√2×HEPES缓冲盐（HeBS），pH7.05
√2mol/L $CaCl_2$
20％（*V/V*）甘油，以2×HeBS配制
1mg/ml新霉素盐溶液（G418，Life Technologies）或10μg/ml普罗霉素（Clontech），以完全MEM/10％FBS配制
冻存培养基，含有10％（*V/V*）DMSO或甘油的完全MEM/10％FBS
√PBS，pH7.5
√DNA浓缩缓冲液
√10×PCR扩增缓冲液，含15mmol/L $MgCl_2$
√10mmol/L 4dNTP混合液
100ng/μl ICP27引物：
　5′端引物：5′-GCC GCC GCG ACG ACC TGG AAT－3′
　3′端引物：5′-TGT GGG GCG CTG GTT GAG GAT-3′
10U/μl *Taq* DNA聚合酶
针对*ICP*27序列的特异性探针
HSV *ICP*27突变体
HSV IE突变体
1％（*m/V*）甲基纤维素覆盖
1％（*m/V*）结晶紫染液
30cm、60cm和100cm组织培养皿
25cm² 组织培养瓶
Beckman GRP冷冻离心机和GH3.7转子
96孔圆底组织培养板
25cm² 组织培养瓶
细胞刮

1. 转染前3天，用1∶10胰酶/EDTA消化Vero细胞，培养2d。
2. 转染前一天，消化细胞1∶2传代到3～5个60mm培养皿中，控制细胞浓度在1×10^6/皿，使用含10％胎牛血清的MEM的完全培养基。培养1d。
3. 对每个皿的转染，先配制转染混合物：2～10μg胶纯化的质粒DNA，用2×HeBS稀释到500μl，冰上孵育20min。准备转染试剂3份。

此质粒必须包含有HSV IE基因启动子调控的*ICP*27编码序列。疱疹病毒实验室可能提供这质粒或者用GenBank的HSV I序列克隆HSV文库。含药物抗性的质粒可以商业购买到（如从Clontech，Stratagene，USB）。

4. 将 34μl 2mol/L $CaCl_2$ 逐滴加入到转染混合物中，混匀后室温孵育 20min。弃培养基并用 1ml 2×HePBS 洗一遍，小心不要让细胞完全干。
5. 上下颠倒混匀转染混合物以破碎大块的沉淀物。小心将转染混合物加入到培养的细胞中，37℃孵育 10min。
6. 每个培养皿中加入 2.5ml 完全培养基，培养 6h。小心弃培养基（不要引起细胞漂浮），再用 1ml 2×HePBS 洗一遍。
7. 每个培养皿中小心加入 2ml 20%的丙三醇。室温孵育 3h。
8. 小心弃掉丙三醇溶液，用 2ml 完全培养基洗 3 遍。再小心加入 3ml 完全培养基，培养 24h。
9. 24h 后，弃培养基，再加入 3ml 完全培养基，培养 48h。
10. 48h 后，用 1.5ml 胰酶/EDTA 消化细胞，4℃，1000g 离心 5min。

对于新霉素抗性克隆

11a. 用 10ml 含 1 mg/ml 新霉素的完全培养基重悬细胞沉淀，按 4×10^5 个细胞/皿接种细胞。

12a. 孵育直至药物抗性的克隆出现，用加入 1mg/ml 新霉素的完全培养基每 3d 换液。

筛选过程在第二到第三个星期内开始。克隆的出现不明显，生长迅速。

注意：不要从含新霉素的培养基中转移细胞

对嘌呤霉素抗性的克隆

11b. 用 3ml 含 10%胎牛血清的 MEM 的完全培养基重悬沉淀物。接种细胞到 100mm 细胞培养皿中。孵育 2～3d（2～3 个分裂周期）直至细胞基本完全汇合。

12b. 用 3ml 完全培养基换液。孵育直至药物抗性的克隆出现，用加入 1mg/ml 嘌呤霉素的完全培养基每 3d 换液。用加入 1mg/ml 嘌呤霉素的含 10%胎牛血清的 MEM 的完全培养基每 3d 换液。

筛选过程从加入药物的 24h 开始。很少细胞可以在药物的处理下存活，但这些存活下来的细胞会不断复制并成为克隆的中心。

为减少假阳性克隆的出现，即使药物抗性的细胞生长的缓慢，也要保持 10μg/ml 的嘌呤霉素浓度。

在药物处理的情况下，嘌呤霉素抗性的克隆没有新霉素抗性的克隆长的好。

13. 克隆中心出现后，轻轻吸出培养基。一滴滴加入 20μl 胰酶/EDTA 到每个分离的克隆中心，以保证它们较好的分离开。
14. 用 200μl 的 TIP 头将培养皿上的克隆刮下，再将每个刮下的细胞克隆转移到装 10ml 含 10%胎牛血清的 MEM 的 15ml 离心管中。在将其按 100μl/孔转移到圆底的 96 孔组织培养板中。培养细胞以增殖克隆。
15. 扩大每个药物抗性的克隆（如 96 孔板中被药物抑制的细胞）到 25cm^2 培养瓶中，用加有适当药物的含 10%胎牛血清的 MEM 的完全培养基培养。当嘌呤霉素抗性的克隆在 25cm^2 培养瓶中生长，将嘌呤霉素的浓度降到 5～7μg/ml 以加速克隆的生长。
16. 用含有合适药物抗性的冻存液冻存细胞。－80℃冷冻后转移到液氮中去。
17. 从药物抗性的细胞克隆中分 5×10^5 个细胞到 30mm 组织培养皿中。培养过夜。

18. 弃培养基并用 PBS 洗一遍。将细胞从培养皿上刮下来再转到 1.5ml 离心管中，25℃高速离心 3min 聚集细胞。
19. 弃上清，加入 200μl DNA 抽提缓冲液来裂解细胞。37℃孵育 1～12h（到无颗粒为止）。将裂解液煮 15min。
20. 制备 PCR 反应混合物（100μl 体系）：
 10μl 10×PCR 扩增缓冲液（含 15mmol/L $MgCl_2$）；
 4μl 10mmol/L dNTP 混合物；
 2μl 100ng/μl *ICP*27 引物对（200ng）；
 2μl 10U/μl *Taq* DNA 聚合酶；
 10μl 裂解液；
 72μl 无菌水。
21. 用下面的扩增程序去扩增溶解产物

 30 个循环：　1min 95℃（变性）
 　　　　　　1min 60℃（退火）
 　　　　　　10min 60℃（延伸）
22. 用琼脂糖凝胶电泳和用 *ICP*27 特异的 DNA 探针进行 Southern 斑点杂交分析 PCR 反应的产物。

 用材料所指中特异的 *ICP*27 基因的引物扩增了长为 219bp 的产物。
23. 从 *ICP*27 阳性克隆中分 1.5×10^6 个细胞接种到 600mm 培养皿中，加 5ml 完全培养基。1 或 2 个皿用来进行突变检测。同时 1～2 个皿的 Vero 细胞用来作为阴性对照。培养 24h。
24. 1×10^3pfu 的 HSV *ICP*27 突变病毒稀释到 500μl 无血清的 MEM 中。孵育 60～90min，每 15min 摇皿一次。
25. 贴壁后，弃病毒培养基，加 3ml 1.0% 甲基纤维素覆盖。孵育直至斑点出现。一旦斑点出现后，弃甲基纤维素。室温用 1%结晶紫染液染色 5min。
26. 弃染液。用自来水轻轻洗皿除去剩余的染料。空气风干。确定补充的细胞系。

 如果新霉素或者嘌呤霉素抗性的克隆可以补充 IE 基因产物（ICP4、ICP27I 或者 CP0），那么斑点就会出现在培养板中。对于含有两个 HSV IE 基因融合的克隆，IE 基因中一个突变体的缺失可以在补偿细胞中生长。要求 IE 基因突变体补偿细胞系可以进行进一步分析以确定最好的补偿细胞。
27. 将 *ICP*27 阳性补充的细胞克隆中的 1.5×10^6 个细胞接种到 600mm 培养皿中，加 3ml 完全培养基，培养 2～4h。
28. 5×10^6 和 1×10^7pfu（MOI＝5 和 10）HSV IE 基因突变体稀释到 500μl 无血清 MEM 中。孵育 60～90min 来吸附细胞，每 15min 摇皿一次。
29. 弃病毒接种体加入 3ml 完全培养基，培养 18～24h。
30. 用细胞刮将细胞从培养板刮下来，转移到 15ml 离心管中。
31. 准备储存液进行滴度测定（支持方案 1，第 4～9 步）。将测滴度的病毒液稀释为 3 个浓度（支持方案 2）

 计算每个细胞产生的颗粒数来确定裂解量。补偿单个 IE 基因突变的抗性克隆

有不同的裂解量。

32. 挑取病毒复制最快的克隆保存，−80℃冷冻后转液氮。

基本方案 2　构建有复制缺陷的载体

一个例子就是，构建有基因组的 HSV-1 复制缺陷的载体，图 12.7.1 中显示出其因为同源重组缺失一个重要的 IE 基因。

材料（标√的条目参见附录 1）

IE 基因-补体细胞系（基本方案 1）

胰蛋白酶/EDTA：0.05%（*m/V*）胰蛋白酶/5.3mmol/L EDTA 溶液（Life Technologies）

√完全的改良的 eagle 培养基加或不加 10%（*V/V*）FBS（完整的线粒体苹果酸酶/10%FBS 和完整的线粒体苹果酸酶）

插入带有报告暗盒的质粒（如 HCMV IEp-*lac*Z-BGH pA；图 12.7.1）去代替 HSV-1 基因

限制性内切核酸酶识别 8bp 的序列，和适当病毒的 DNA 缓冲液

病毒 DNA（支持方案 3）

√2×HEPES 缓冲液（HeBS），pH7.05

√2mol/L $CaCl_2$

20%（*V/V*）甘油（2×HeBS 溶解，pH7.05）

√0.1%β-D-乳糖苷染色溶液

√PBS（pH7.5）

√提取 DNA 的缓冲液

√含 15mmol/L $MgCl_2$ 的 10×PCR 扩增缓冲液

√10mmol/L 4dNTP 混合液

100ng /μl *ICP*27 引物对：

5′引物：5′-GCC GCC GCG ACG ACC TGG AAT-3′

3′引物：5′-TGT GGG GCG CTG GTT GAG GAT-3′

100ng /μl 糖蛋白 B（*gB*）引物对：

5′引物：5′-ATT CTC CTC CGA CGC CAT ATC CAC CAC CTT-3′

3′引物：5′-AGA AAG CCC CCA TTG GCC AGG TAG-3′

10U/μl *Taq* DNA 聚合酶

灭菌水

*ICP*27 或 *gB* 序列的 DNA 探针

30mm 和 60mm 组织培养皿

宽孔移液管（Bio-Rad）

细胞刮

Beckman 通用记录器冷藏桌面离心和 GH3.7 摇床超声破碎器加电极杯（VirTis）

振荡器台（如 Nutator，Becton Dickinson Primary Care Diagnostics）

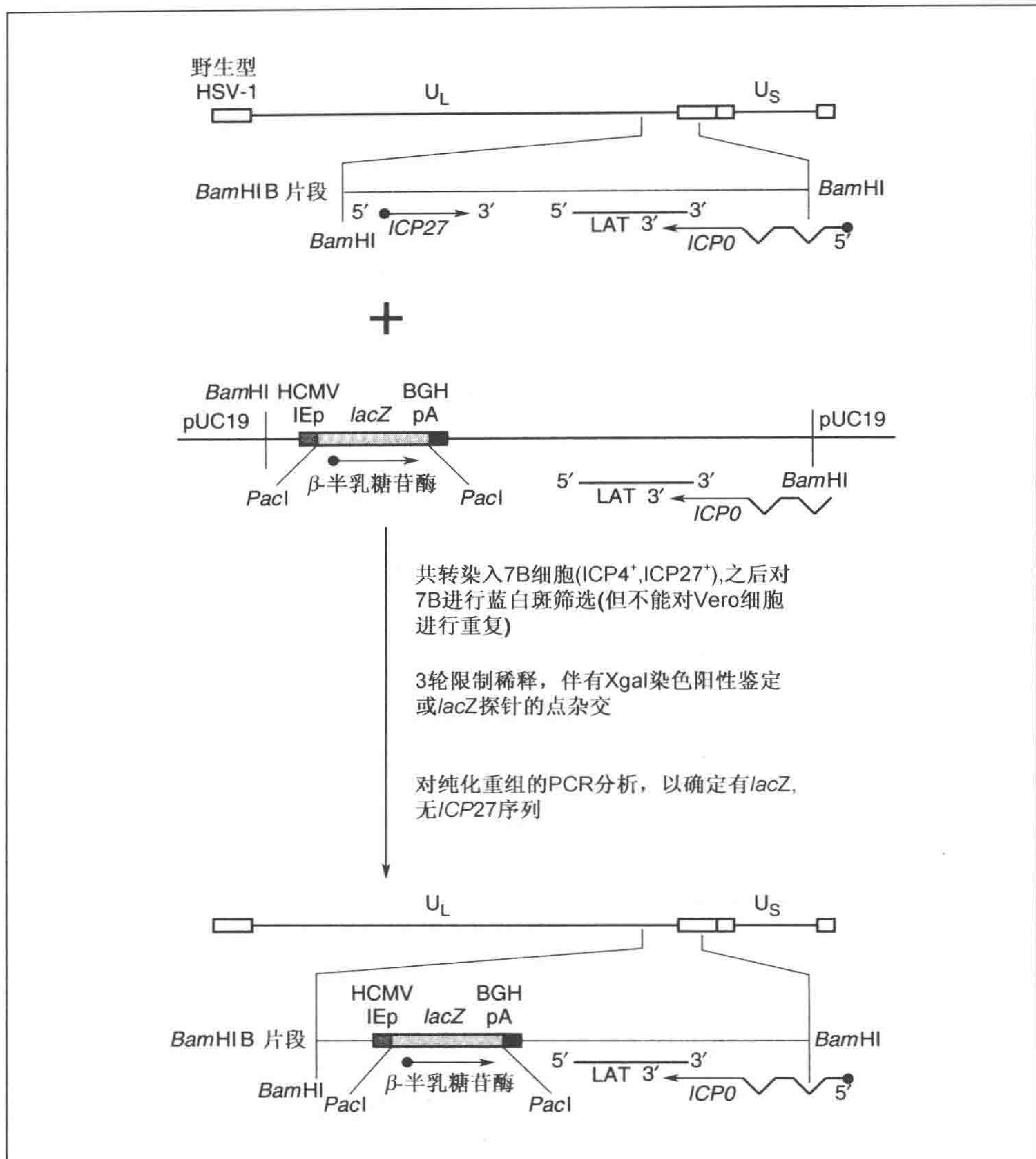


图 12.7.1　一通过同源重组建立的基因组 HSV-1 载体缺失型复制缺陷的示例（基本方案 2）。纯化的野生型 HSV-1DNA 与一质粒共转染入 *ICP*4/*ICP*27 补足的 7B 细胞系，该质粒含有 HSV-1 基因组的 *Bam*HⅠ B 片段，还有取代了 HCMV IEp-*lac*Z-BGHpA 表达框的 *ICP*27IE 基因序列。尽管野生型病毒基因组内无 *Pac*Ⅰ位点，该质粒设计时，在 *lac*Z 报告基因侧翼加入 *Pac*Ⅰ限制性内切核酸酶识别位点。质粒中 HSV-1 侧翼序列与野生型病毒基因组内序列的同源重组导致 *ICP*27 缺失型可在 7B 补足细胞系上生长，但不能在 Vero 细胞上生长。因为同源重组的同时也含有 HCMV IEp-*lacZ-BGH pA* 表达框，它可以通过 Xgal 染色做限制稀释的方法很容易地分离和纯化（对野生型亲本可利用蓝白筛选）。*ICP*27 缺失以及表达框的存在能通过 PCR 加以确定。缩写：BGH pA，牛生长荷尔蒙多腺苷酸和剪切序列；HCMV IEp，人细胞巨化病毒及时启动子；ICP，受染的细胞蛋白；LAT，潜伏期相关的转录本；UL，HSV-1 基因组的特有长片段；US，HSV-1 基因组的特有短片段。

多渠道吸管操纵器和试剂储器（Costar ）

96 孔培养平板

1. 转染前 3 天，分开培养 IE 基因——用 1∶10 胰蛋白酶/EDTA 培养补足型细胞系，使细胞在完全培养基中生长，培养 2d。
2. 转染前 1 天，再一次用胰蛋白酶/EDTA 分开培养，4 个 60mm 组织培养皿的每个都种 1×10^6 细胞到 3ml 完全培养基中，培养 1d。
3. 用报告暗盒线性化质粒，通过限制性内切核酸酶切掉 HSV-1 序列和在细菌载体上的任何存在的 *E. coli* DNA 序列。
4. 用大孔的 Tip，制备转染液，每个平皿加 1～5μg 的病毒 DNA（转染后产生≥200 个噬菌斑），相当于每个线性质粒 DNA 对等 10～50 个病毒基因组 DNA。

    一个病毒 DNA 相当于 152kb。

5. 加 600μl 2×HeBS 到每个管子，混匀冰上孵育 20min，然后，逐滴加 41μl 2mol/L $CaCl_2$，轻混匀，室温孵育 20min。
6. 吸去平皿中的培养基，每次一个平皿。用 1ml 2×HeBS 清洗一次，吸尽，但在转染混合液添加前不能使平皿变干。
7. 移液器反复吹打转染混合液打碎大的沉淀物，然后小心添加到单层生长的细胞上，一次一个平皿，孵育 40min。
8. 每个平皿小心加入 4ml 完全培养基 MEM（含 10％FBS），不要破坏转染混合物，孵育 4h。
9. 4h 孵育结束后，吸尽培养基及转染混合液。1ml 2×HeBS 清洗一次，不要破坏细胞的单层，吸尽。小心缓慢加入 2ml 20％甘油，室温严格孵育 4min。
10. 小心吸尽甘油，用 2ml 完全培养基 MEM（含 10％FBS）清洗 3 次，确保细胞单层不被破坏。
11. 小心加入 4ml 完全培养基 MEM（含 10％FBS），孵育。每天显微观察两次，看病理效应的形成（CPE），CPE 表明感染斑的形成。

    CPE 产生时细胞呈圆形，多泡状。一般需要 3～5 天才能观察到 CPE，依病毒及细胞类型不同而改变。

12. 在噬菌斑破裂后（噬菌斑中央细胞死亡裂解），收集培养基暂时在 4℃保存。
13. 刮取细胞到 1ml 完全培养基 MEM（含 10％FBS），转移到 15ml 离心管。2000*g*，4℃离心 5min 后，250μl 完全培养基 MEM（含 10％FBS）重悬。
14. −80℃及 37℃反复冻融三次裂解细胞释放病毒颗粒，用 cup-horn 超声仪超声破碎细胞 5s，2000*g*，4℃离心 5min。
15. 收集上清，与第 12 步收集的培养基混匀，−80℃保存备用，作为重组病毒母液。
16. 检测重组病毒母液的滴度（支持方案 2）。
17. 15ml 离心管中加入 3ml 完全培养基 MEM（含 10％ FBS），含 1×10^6 IE 基因互补细胞，加 30pfu 的重组病毒。蜡膜封口，37℃摇床孵育 1h。
18. 感染完毕后，加入 7ml 完全培养基 MEM（含 10％ FBS），并且转移到多孔板中储存池中，用多孔道移液器转移 100μl 到 96 孔板的底部。孵育 2～5d，每天两次检测噬菌斑的形成，不要感染过度。

19. 挑取只感染单个噬菌斑的孔，转移其上清到新的 96 孔板中，−80℃保存（病毒母液）。
20. 用排枪将 100μl Xgal 染液覆盖培养板。37℃孵育过夜（某些情况下，1～2h 可观察到蓝斑）。
21. 阳性对照置于另外两个孔进行限制分析（第 16～20 步）以确保病毒株的纯度。
22. 最终纯化后，用病毒株生成 midistock（支持方案 1）。
23. 将 5×10^5 耐药的 IE 基因-补充（如 *ICP*27 阳性）克隆种植于 30mm 组织培养皿中。培养过夜（次日皿将应从分汇合状态生长到汇合状态）。
24. 抽取培养基并加入来自 midistock 制品的 1×10^7pfu 病毒（第 22 步；MOI=10）在 500μl 完全无血清培养基中。孵育 60～90min，每隔 15min 摇晃瓶子以确保接种物平均分布。
25. 吸附反应后抽吸接种物，并加入 2ml 完全 MEM/10%培养基，孵育 12～16h。
26. 抽吸培养基，用 1ml PBS pH7.5 洗细胞。刮下细胞，转移至 1.5ml 微型离心管。以最大超速室温离心 3min 沉淀细胞。
27. 抽吸上清液。加入 200μl DNA 抽提缓冲液，37℃孵育 1～2h 裂解细胞。煮细胞 15min。
28. 准备 PCR 反应混合物（反应体系 90μl）：
    10μl 10×PCR 扩增缓冲液，含 15mmol/L $MgCl_2$；
    4μl 10mmol/L 4dNTP 混合物；
    2μl 100ng/μl *ICP*27 或 *gB* 引物对；
    2μl 10U/μl *Taq* DNA 聚合酶；
    72μl 无菌水。
29. 扩增反应后，加入 10μl 煮沸的裂解产物再加含 PCR 分析缓冲液 *ICP*27 或 *gB* 引物对：

30 个循环	1min	95℃（变性）
	1min	60℃（退火）
	10min	71℃（延伸）

30. 以 *ICP*27 或 *gB* 特异性 DNA 为探针通过 Southern blot 杂交分析 RT-PCR 反应产物。

以材料列表中的引物扩增的 ICP27 或 gB 长度分别为 219bp 及 191bp。

基本方案 3　将外源基因序列插入到复制缺陷性基因组人类单纯疱疹病毒（HSV）载体

图 12.7.2 所示通过同源重组构建插入外源基因的复制缺陷性基因组Ⅰ型人类单纯疱疹病毒（HSV-1）载体。

通过这种方法获得的重组频率至少是标准标记转移方法的 10 倍。

斑点印迹或 Southern blot 杂交（附录 3G）可以证实外源基因整合至复制缺陷性基因组 HSV-1 载体的基因组中。此外，PCR 也可以检测外源基因序列的存在。反转录（RT）-PCR 可验证复制缺陷性病毒载体外源基因表达产物，也可根据基因产物选择

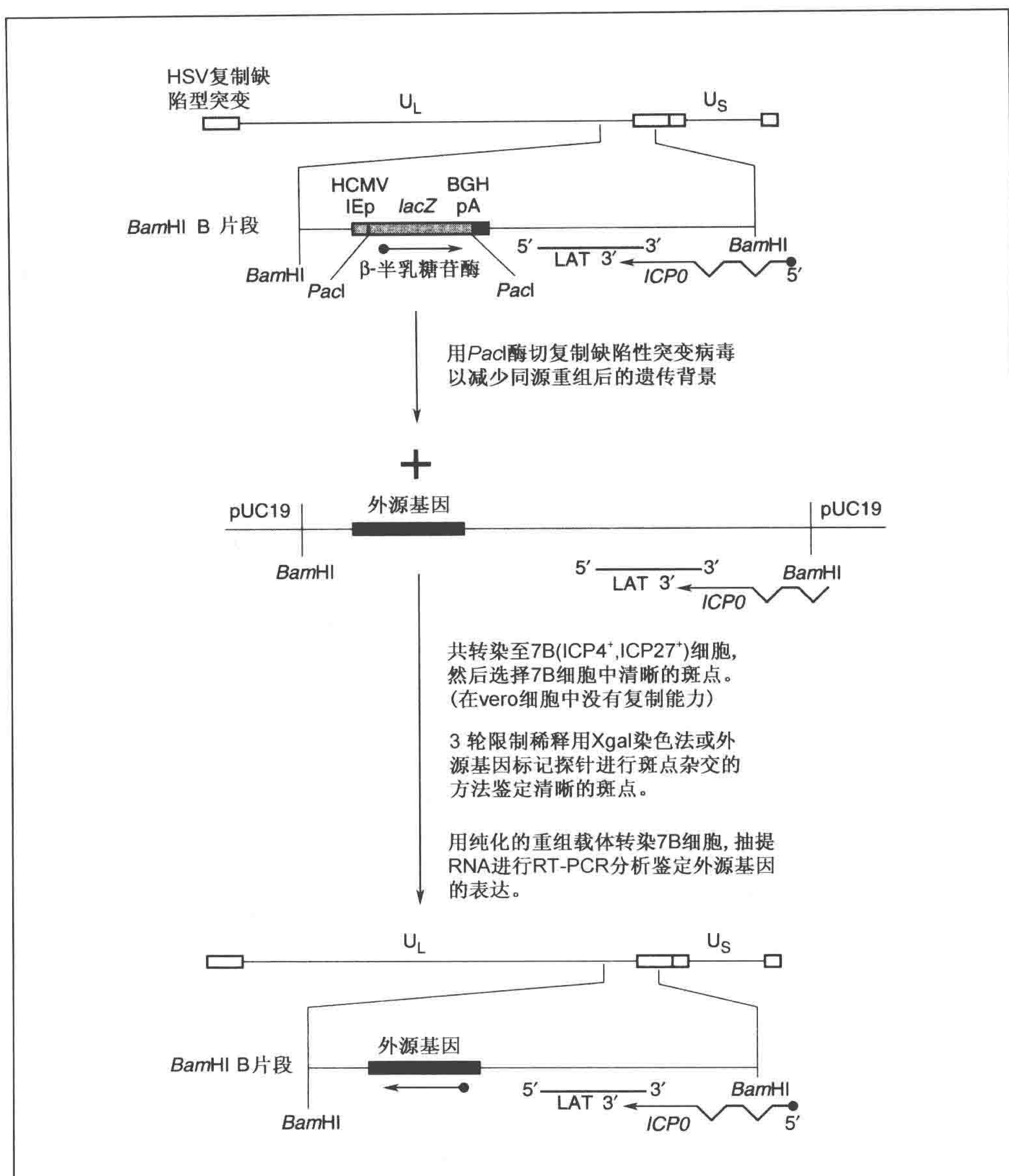


图 12.7.2　通过同源重组构建插入外源基因的复制缺陷性基因组Ⅰ型人类单纯疱疹病毒（HSV-1）载体（基本方案 3）。用 *Pac*Ⅰ限制性内切核酸酶酶切突变体病毒 DNA，通过同源重组将外源基因介导进入 *ICP27*-复制缺陷型突变体载体中。*Pac*Ⅰ酶切减少了亲代病毒的背景水平，提供了游离端，从而提高了同源重组的频率。目的外源基因置换了 *ICP27* 基因序列，重组 *Bam*HI B 质粒与 *ICP27*-复制缺陷性突变体病毒 DNA 共转染至 *ICP4*/*ICP27*-补充 7B 细胞。同源重组后，通过有限稀释从蓝斑亲代病毒中分离纯化出清晰的斑点。RT-PCR 分析确定外源基因的表达。缩写：BCH pA，牛生长激素多腺苷酸化及分裂序列；HCMV IEp，人类巨细胞病毒立即早期启动子；*ICP*，转染细胞蛋白；LAT，潜伏相关转录物；UL，HSV-1 基因组长片段；US，HSV-1 基因组短片段。

Northern blot（附录 3H）、免疫印迹（CPMB UNIT10. 8）或 ELISA（CPMB UNIT 11. 3）监控其表达。

材料（标√的条目参见附录 1）

IE 基因补充细胞（基本方案 1）
复制缺陷性 HSV 载体（基本方案 2）在制造商推荐的条件下用 *Pac* Ⅰ酶酶切
带外源基因的质粒用适当的限制性内切核酸酶使其线性化
在 24 孔板中单层培养 IE 基因补充细胞系（基本方案 1）
√完全改良的基础培养基/10%（*V/V*）FBS 及无血清培养基（完全 MEM/10% FBS 及完全 MEM）
√三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水（TBS），pH7. 5
√DNA 抽提缓冲液
√25：24：1（*V/V/V*）苯酚/氯仿/异戊醇
氯仿
异丙醇，−20℃
70%乙醇
总 RNA 分离试剂（TRI 试剂，分子研究中心）
1-溴-3-氯丙烷（BCP，Aldrich）
核糖核酸酶-胰脱氧核糖核酸酶Ⅰ（Worthington）
10U/μl 反转录酶及其缓冲液（如 SuperScript Ⅱ和 5×SuperScript Ⅱ缓冲液，Life Technologies）
√1. 0mmol/L DTT
100ng/μl 乳糖操纵子 Z（*lacZ*）引物对：
　5′ 引物：5′-ACC CCT TCA TTG ACC TCA AC-3′
　3′ 引物：5′-ATT GGG GGT AGG AAC ACG-3′
100ng/μl 磷酸甘油醛脱氢酶（*GAPDH*）引物对：
　5′ 引物：5′-TTG CTG ATT CGA GGG GTT AAC CGT CAC GAG-3′
　3′ 引物：5′-ACC AGA TGA TCA CAC TGC GGT GAT TAC GAT-3′
100ng/μl 外源基因引物对
√10mmol/L 4 种三磷酸脱氧核苷混合物
胎盘 RNA 酶抑制剂：50～100U/μl 核糖核酸酶抑制剂（Promega）
灭菌水
√10×PCR 扩增缓冲液，含 15nmol/L $CaCl_2$
外源基因序列的 DNA 探针
10U/μl *Taq* DNA 聚合酶
摇床（如 Nutator、Becton Dickinson Primary Care Diagnostics）
30mm 组织培养皿
96 孔平板及 24 孔组织培养板
1. 5ml 微量离心管

研磨杵（Kontes Glass）

1. 将经 *Pac* Ⅰ 酶切的复制缺陷型 HSV 载体与含外源基因的线性化质粒共转染 IE 基因补充细胞培养。在 96 孔平底组织培养板中分离出单个斑点。（基本方案 2，第 1～18 步）。
2. 从每个板孔中转移 80μl 培养基到一个新的 96 孔板。将新板保存于－80℃（病毒株）。
3. 在每个板孔中将剩余的 20μl 培养基（含病毒）与 100μl 完全培养基/10% FBS 混合。从 IE 基因补充细胞的培养板孔从吸取培养基到一个 24 孔板，并加入 120μl 含病毒的培养基。孵育 60～90min，每隔 15min 摇晃一次培养板以保证接种物平衡分布。
4. 吸附反应后，抽吸接种物，然后加入 1ml 新鲜的完全 MEM/10%FBS 培养基。孵育 2～3d。检测培养物并以细胞变圆作为细胞病变效应（CPE）的证据（基本方案 2，第 11 步）。
5. 用微量移液器 tip 刮擦每个孔单细胞层，转移悬浮液至 1.5ml 微量离心管。室温下以最大超速离心 10min 以沉淀细胞及病毒。
6. 小心吸取上清液，用 500μl pH7.5 TBS 洗沉淀。以最大超速离心 5min 以沉淀细胞及病毒。抽吸上清液。
7. 用 200μl DNA 抽提缓冲液重悬沉淀。37℃摇床孵育过夜。
8. 200μl 25∶24∶1 苯酚/氯仿/异戊醇抽提溶胞产物。剧烈涡旋混合两相。
9. 室温下以最大超速离心 5min 以分离两相。去除下层（有机）相，保留上层水相及界面。
10. 200μl 氯仿抽提水相。颠倒混合两相。室温下最大超速离心 2min 以分离两相。转移上层（水相）至新试管。

    由于 DNA 极端黏稠，将呈可见的黏液吸入吸量管。

11. 加 500μl －20℃异丙醇沉淀病毒 DNA。室温下以最大超速离心 15min。小心抽吸上清液。
12. 用 500μl 70%乙醇洗沉淀，颠倒。离心 5min。抽吸上清液，自然晾干。
13. 50μl 水重悬沉淀。使用插入外源基因序列特异性 DNA 探针进行斑点印迹或 Southern blot 杂交（附录 3G）以分析病毒 DNA。
14. 取 1×10^5 IE 基因补充细胞种植至 30mm 组织培养皿。孵育过夜。（孵育后板子从非汇合到汇合）
15. 抽吸培养基，加入含 1×10^7 pfu 含外源基因重组病毒（第 2 步；MOI＝10；见病毒滴度测定）500μl 无血清 MEM 培养基。孵育 60～90min，每隔 15min 摇晃一次皿以保证接种物平衡分布。
16. 吸附反应后，抽吸接种物，然后加入 2ml 的完全 MEM/10% FBS 培养基。孵育 12～16h。
17. 每个皿中加入 0.8ml TRI 试剂溶解细胞。刮擦皿并转移细胞溶解物至一无菌 1.5ml 的微量离心管中。匀浆器使溶胞产物均匀化，并在室温下孵育 5min。
18. 在溶胞产物中加入 0.1ml BCP，涡旋 15s。室温孵育 2～3min。
19. 室温以最大超速离心 15min，转移上层（水相；RNA）到一个新的 1.5ml 离心管。
20. 加入 0.5ml－20℃异丙醇沉淀 RNA，室温孵育 10min。室温最大超速离心 10min。

21. 70% 乙醇洗涤 RNA。室温最大超速离心 5min。抽吸上清液并自然晾干。
22. 50μl 水溶解抽提的 RNA。加 1000U 核糖核酸酶-胰脱氧核糖核酸酶 I 破坏 DNA 模板 37℃孵育 60min。
23. 75℃孵育 10min 使酶失活。准备 RT-PCR 分析缓冲液（每次反应 20μl）：
    4μl 5×SuperScript Ⅱ缓冲液；
    2μl 1.0mmol/L DTT；
    1μl 100ng/μl 外源基因，乳糖操纵子 Z 或 *GADPH* 阳性细胞对照；
    1μl 10mmol/L 4dNTP 混合物；
    1μl 10U/μl SuperScript Ⅱ反转录酶；
    5μl RNA 样品；
    5μl 无菌水；
    37℃孵育 30min。
24. 准备 PCR 分析缓冲液（每次反应 80μl）：
    10μl 10×PCR 扩增缓冲液，含 15mmol/L $MgCl_2$；
    4μl 10mmol/L 4dNTP 混合物；
    1μl 100ng/μl 外源基因，乳糖操纵子 Z 或 *GADPH* 引物对；
    1μl 10U/μl *Taq* DNA 聚合酶；
    64μl 无菌水。
25. 加入 PCR 分析缓冲液使 RT-PCR 反应体积达 100μl。按下列程序扩增：

30 个循环	1min	95℃（变性）
	1min	60℃（退火）
	10min	71℃（延伸）

26. 以外源目的基因，乳糖操纵子 Z（阴性），或细胞因子对照 *GAPDH* 的特异性 DNA 为探针通过 Southern blot 杂交分析 RT-PCR 反应产物。

    以材料列表中的引物扩增的 *GAPDH* 及 *lacZ* 片段长度分别为 614bp 及 324bp。如果外源基因插入到载体中，则 *lacZ* 片段应该不能检测到。

支持方案 1　单纯疱疹病毒系的制备

材料（标√的条目参见附录 1）

适合于病毒生长的受体细胞
已知滴度的病毒株（支持方案 2）
√完全改良的基础培养基/10%（*V/V*）FBS 及无血清培养基（完全 MEM/10%FBS 及完全 MEM）
1mol/L HEPES（*N*-2-羟乙基哌嗪-2-乙磺酸）
$25cm^2$ 组织培养瓶
15ml 及 50ml 圆锥形聚丙烯离心管
Beckman GPR 制冷台式离心机及 GH3.7 浮桶式离心机
Cup-horn 超声破碎器（VirTis）

50ml 聚丙烯 Oak 离心管
Beckman J2-21M 制备离心机和 JA-20 转子（制备）
$850cm^2$ 组织培养滚瓶
滚子摇瓶装置
细胞刮棒

1. 种植 1.0×10^6 个受体细胞于 $25cm^2$ 组织培养瓶。孵育 1～2d（直到细胞活性分裂）。
2. 转染当天，从单层细胞抽吸培养基。加入含 3×10^4 pfu 病毒（MOI =0.01）的 1ml 无血清 MEM 培养基。孵育 60～90min 使病毒吸附于细胞上，每隔 15min 摇晃瓶子以保证接种物平衡分布。
3. 抽吸接种物，加入 10ml 完全 MEM/10%FBS 培养基。孵育直至所有的细胞显示细胞病变效应（CPE）。例如，聚集并开始从瓶底脱落；每天检测细胞两次。
4. 通过轻叩或刮擦瓶底移去细胞。转移细胞悬液到 15ml 圆锥形聚丙烯离心管中。4℃，1500*g* 离心 5min。
5. 将上清液移至新试管中，4℃短时保存。用完全 MEM/10% FBS 培养基重悬沉淀使终体积为 1ml。
6. 冷冻（－80℃）及溶解（37℃）转染细胞悬液 3 次。用 Cup-horn 超声破碎器高频声波分裂混悬液 5s，4℃ 2000*g* 离心 5min 沉淀碎片。
7. 将上清液与保存于 4℃的上清液（第 5 步）混合，转移至 50ml 聚丙烯 Oak 离心管。4℃ 48 000*g* 离心 30min 沉淀病毒。
8. 小心抽吸上清液，以完全 MEM/10% FBS 培养基重悬沉淀使终体积达 1ml。测定病毒的滴定度（支持方案 2）。
9. 将病毒制品分装至 2ml 冷冻管，保存于－80℃备用。
10. 在两个 $850cm^2$ 滚瓶中分别种植 2.0×10^7 个受体细胞。孵育 1～2d。
11. 转染当天，倾倒瓶中的培养基。每个瓶中加入含 1×10^6 pfu 病毒（MOI = 0.01）完全无血清培养基 20ml。使病毒在滚瓶装置中 37℃吸附 60～90min。
12. 吸附反应后，倒出接种物，每瓶加入 100～125ml 完全 MEM/10% FBS 培养基。37℃孵育至所有细胞聚集并从表面分离。每天至少观察细胞两次以获取准确的收获时间。
13. 用细胞刮移去滚瓶表面的细胞。将混悬液移至 50ml 圆锥形离心管。4℃，1500*g* 离心 5min 沉淀转染细胞。
14. 将上清液移至新试管，4℃短时保存。完全 MEM/10% FBS 培养基重悬沉淀物使终体积达 2ml。
15. 冷冻（－80℃）及（37℃）转染细胞 3 次，注意防止试管爆裂。用超声破碎器处理混悬液 5s，4℃，2000*g* 沉淀细胞碎片。
16. 将上清液与 4℃保存的上清液（第 14 步）。转移至冰上 50ml 聚丙烯 Oak Ridge 试管。4℃，48 000*g* 离心 30min。
17. 小心抽吸上清液。完全 MEM/10%FBS 培养基重悬沉淀物终体积达 1～2ml。分装 100μl 到 2ml 试管中－80℃保存。

减少传代次数以避免缺失必需基因的病毒增殖过程中野生型病毒的增殖机率。

18. 测定病毒株的滴定度（支持方案 2）。
19. 任意：为了进一步纯化病毒，PBS 重悬沉淀，蔗糖、T-10 葡聚糖或 Nycodenz 梯度纯化（如 CPMB UNIT 16.11）。储存前加入 10%的甘油。

    蔗糖梯度纯化是用线性 30%～65%梯度，4℃，71 000g 离心 16h。

支持方案 2　噬菌斑分析测定病毒滴定度

本分析试验需重复 2 或 3 次。

材料（标√的条目参见附录 1）

适合于病毒生长的受体细胞
用于滴定的病毒株
√完全改良的基础培养基/10%（V/V）FBS 及无血清培养基（完全 MEM/10%FBS 及完全 MEM）
√1%（m/V）甲基纤维素
√1%（m/V）龙胆紫溶液
12 孔组织培养板

1. 将 1.0×10^5 个受体细胞种植于 12 孔组织培养板中。孵育过夜直至细胞形成几近汇合的单层细胞。
2. 第二天，制备含 10 倍稀释浓度（10^{-5}～10^{-10}）病毒 1ml 完全无血清 MEM。将双份 100μl 稀释液到受体细胞孔中。37℃孵育 60～90min 使病毒吸附，每隔 15min 摇晃一次板子 4 种植物平衡分布。
3. 吸附反应后，抽吸病毒接种物。加入 1ml 1.0%甲基纤维素覆盖。孵育 3～5d 直到界限清晰的斑点出现。
4. 当斑点清晰可见时，抽吸甲基纤维素。用 1ml 1%龙胆紫室温染色 5min。
5. 抽吸染液，用自来水轻柔冲洗板子去除过量的染色液。自然晾干。
6. 计算每个孔的斑点数。确定每个稀释孔中斑点的平均数，乘以 10 得到各个稀释孔每毫升斑点形成单位数。这个数值在乘以 10 到稀释倍数得到病毒株每毫升噬斑形成单位（pfu/ml）的滴定度。

支持方案 3　分离病毒 DNA

病毒 DNA 的转染性是通过计算病毒 DNA 转染进入受纳细胞后每微克病毒 DNA 产生的斑点数的比率来衡量。纯化病毒 DNA 使每毫克纯化的病毒 DNA 100～1000 个斑点。

材料（标√的条目参见附录 1）

单层受体细胞，培养于 $150cm^2$ 组织培养瓶及 60mm 组织培养皿
已知滴度的 HSV-1 病毒株（支持方案 1）
√完全改良基本培养基/10% FBS 及吴血清完全改良基本培养基（完全 MEM/10% FBS 及完全无血清 MEM）

√三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水（TBS），pH7.5
√DNA 抽提缓冲液
√25∶24∶1（*V*/*V*/*V*）苯酚/氯仿/异戊醇
氯仿
异丙醇，−20℃
70%乙醇
标记总 HSV-1 病毒 DNA
√1 %（*m*/*V*）甲基纤维素
√1 %（*m*/*V*）龙胆紫溶液
150cm² 组织培养瓶
细胞刮（任选）
15ml 圆锥形聚丙烯试管
Beckman GPR 制冷台式离心机及 GH-3.7 浮桶式离心机
摇床（如 Nutator、Becton Dickinson Primary Care Diagnostics）
热封闭巴斯德吸管
宽口移液管 Tip（Bio-Rad）

1. 吸取 150cm² 组织培养瓶（约 1.7×10^7 个细胞）中从非汇合到汇合生长单层细胞的培养基。

   在转染前 3d 和前 1 天细胞应该 1∶2 传代，以确保细胞是快速增殖。

   细胞的选择应该根据它是需要，去互补必需的 IE 基因缺失突变还是多基因突变，或者是野生型病毒。

2. 细胞接种在 5ml 无血清完全培养基，5.0×10^7pfu 病毒（MOI=3）转染，37℃孵育 60～90min，每 15min 摇动培养瓶一次，使接种物分散均匀。
3. 感染完毕后，吸去接种物，加入 20ml 完全培养基 MEM（含 10%FBS）。孵育 18～24h。定时检测 CPE 的形成（以细胞变圆但仍然贴壁为标准）。
4. 剧烈拍打培养瓶或者用细胞刮，收集细胞。转移细胞悬液到 15ml 离心管中，2000*g*，4℃离心 5～10min。
5. 去除上清液，5ml TBS（pH 7.5）重悬。
6. 汇集两管 5ml 悬液到一个管子，1500～2000*g*，4℃离心 5～10min。
7. 加 5ml DNA 抽提缓冲液，上下颠倒数次重悬细胞，37℃摇床孵育过夜。

   重要提示：不要振荡细胞悬液，以防止破坏病毒 DNA。

8. 加 5ml 苯酚∶氯仿∶异丙醇为 25∶24∶1 的混合液，轻柔颠倒混匀，不能振荡。
9. 室温 2000*g* 离心 5min，弃去下层有机相，保留中间层。
10. 加 5ml 氯仿轻柔颠倒混匀，室温 2000*g* 离心 5min，转移尽可能多的水相到新的 15ml 离心管。

    病毒 DNA 在中间层，十分黏稠，在移取时会呈泥浆状黏在移液器上。

11. 加 10ml −20℃预冷异丙醇，混匀后沉淀 DNA。用热封口的巴斯德管缠绕 DNA，移出缠绕的 DNA 转移沉淀物到新的 15ml 离心管。折断巴斯德管，使黏有 DNA 的那一段保留在离心管中，过夜风干 DNA，宽口的 Tip 加 1ml 水重悬。

12. 260nm、280nm 紫外分光光度计测量 DNA 浓度（附录 3D；纯的制备物在 $A_{260/280}>1.7$）。
13. Southern 杂交时，用几种限制性内切核酸酶酶切 1μg 病毒 DNA，琼脂糖凝胶电泳分离酶切产物（附录 3G）。应用附录 3G 中描述的条件进行转膜和杂交，当利用 HSV-1 病毒 DNA 为探针检测病毒 DNA 完整性时除外。
14. 取 1μg 由第 11 步得来的病毒 DNA，在 60mm 培养皿中转染受体细胞（基本方案 2，第 1～10 步，跳过质粒共转染这一步）。小心加入 4ml 完全培养基 MEM（含 10% FBS），孵育 24h。
15. 转染后的第一天，去除培养基，加入 3ml 1%的甲基纤维素溶液。孵育并定期检查特征性噬菌斑的形成。
16. 一旦噬菌斑形成，吸去上层，加入 2ml 1%结晶紫染液。室温孵育 5min，吸去染液，流水冲洗，风干。
17. 计算每平板的噬菌斑数目，计算每个每 mgDNA 所形成的噬菌颗粒的数目。

好的产物为每毫克 DNA 形成 100～1000 个噬菌斑。

参考文献：Alvira *et al.*，1999；DeLuca *et al.*，1985；Krisky *et al.*，1998；Rasty *et al.*，1995；Samaniego *et al.*，1998

编者：William F. Goins，Peggy Marconi，David Krisky，Darren Wolfe，Joseph C. Glorioso，Ramesh Ramakrishnan，and David J. Fink

单元 12.8　应用辅助病毒缺陷 HSV-1 扩增载体进行基因传递

通过同源重组，许多带有部分或全部 HSV-1 基因组的 cos 质粒可以形成环状复制型的病毒，产生感染性的病毒颗粒。但是，如果 DNA 的剪切/包装信号（*pac*）缺失，重组的病毒基因组就不能够进行包装，但在辅助病毒作用下仍能形成可共转染的复制型 DNA。这些包装好的复制型 DNA 可以不依赖于辅助病毒（图 12.8.1）。

注意： HSV-1 是人类病原体。在涉及 HSV-1 病毒或者基于 HSV-1 病毒的工作符合生物安全 2 级标准。

注意： 所有接触细胞的溶液和设备都应当无菌，并且保证无菌操作。

注意： 所有的细胞培养除非标明，均在 37℃，5% CO_2 的加湿培养箱中培养。

基本方案　辅助病毒缺陷复制子储存液的制备

在实验室进行该实验时推荐使用表达报告基因的 HSV-1 复制子，绿色荧光蛋白 GFP 为理想的报告基因。

材料（标√的条目参见附录 1）

2-2 细胞（Smith *et al.*，1992）

杜氏改良培养基（Life Technologies）含有 10%和 6%胎牛血清（DMEM/10% FBS and DMEM/6%FBS）

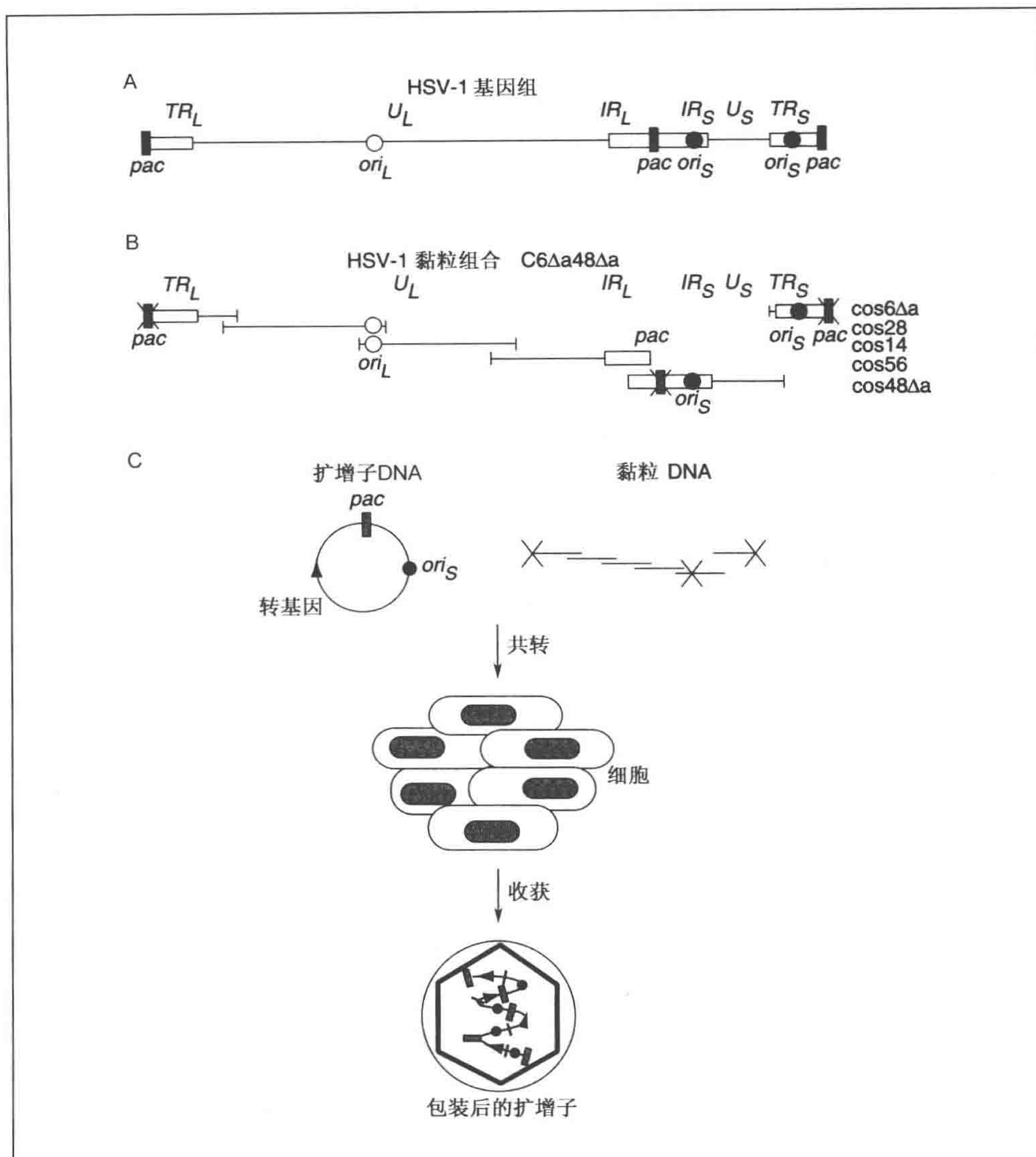


图 12.8.1　HSV-1 扩增子进入 HSV-1 颗粒的无辅助病毒包装。(A) HSV-1 基因组 (152kb) 是由一个长的区段 U_L 和一个短的区段 U_S 组成（水平线），它们的两侧都是反向重复（空白矩形）；IR_S，短区段的内部重复；TR_S，短区段的末端重复；TR_L，长区段的内部重复；TR_L，长区段的末端重复。同时图中示明了 DNA 复制起点，ori_S（实圆圈）、ori_L（空圆圈），DNA 断裂/包装信号，*pac*（实矩形）。(B) 带有缺失性 *pac* 信号（×）的 *HSV*-1 黏粒组合 C6Δa48Δa 包括 cos6Δa、cos14、cos28、cos48Δa 和 cos56。(C) 为了扩增子进入 HSV-1 颗粒的无辅助病毒包装，易感于 HSV-1 复制的细胞被扩增子 DNA 和来自黏粒组合 C6Δa48Δa 的 DNA 共转染。没有 *pac* 信号，黏粒组合就不能产生一个能包装 HSV-1 基因组，但能提供复制和扩增子 DNA 包装所需的所有功能，其中包含一个有功能的 *pac* 信号。合成载体的过程中根本不需要辅助病毒。

G418（Geneticin；Life Technologies ）
0.25%胰蛋白酶/0.02%EDTA（Life Technologies）
Opti-MEM Ⅰ 去血清培养基（Life Technologies）
C6Δa48Δa 系列 *Pac* Ⅰ酶切的 cos 质粒（支持方案 1）
HSV-1 复制子 DNA（从 *E. coli* 中大量抽提）
LipofectAMINE 试剂（Life Technologies）
√PBS 溶解 10%、30%、60%蔗糖溶液（*m/V*）
75cm² 组织培养瓶
37℃，5% CO_2 的加湿培养箱
60mm 直径组织培养皿
15ml 锥底离心管
干冰/乙醇浴
Probe 超声仪
0.45μm 针式过滤器（Sarstedt 聚醚砜膜过滤器）
20ml 一次性注射器
30ml 离心管（Beckman Ultra-Clear 25mm×89mm 和 14mm×95mm）
Sorvall SS-34 转子
Fiber-optic illuminator
Beckman SW28 和 SW40 转子的超速离心机

1. 在 DMEM/10% FBS（含 500μg /ml G418）中培养 2-2 细胞。每周传代两次，每次取约 1/5 新鲜培养基（20ml）到新的 75cm² 组织培养瓶。
2. 转染前一天，除去培养基，PBS 清洗培养板两次，然后加一薄层胰蛋白酶/EDTA，37℃孵育 10min 使细胞从培养板上脱离。血球计数板进行细胞计数（附录 3I）后接种 1.2×10^6 个细胞到 60mm 培养皿中，加 3ml DMEM/10%FBS。
3. 每个需要转染的 60mm 培养皿，加 100μl Opti-MEM Ⅰ 去血清培养基到每个 15ml 离心管中。其中一个 15ml 离心管，加 2μg *Pac*Ⅰ酶切的 cos 质粒混合物（5 种克隆，每种 0.4μg；支持方案 1）和 0.6μg 复制子 DNA。另一个离心管，加入 12μl LipofectAMINE。
4. 汇集两个管子中的物质，混匀（不能振荡），室温孵育 45min。
5. 取 2ml Opti-MEM Ⅰ清洗前一天得到的培养物（第 2 步）。加 1.1ml Opti-MEM Ⅰ 到第 4 步制备好的含有 DNA-LipofectAMINE 转染混合液的管子中（总体积 1.3ml）。吸去培养基（细胞为 100%汇合），加转染混合液，孵育 5.5h。
6. 吸去转染混合液，2ml Opti-MEM Ⅰ 清洗细胞 3 次，加 3.5ml DMEM/6%FBS 孵育2～3d。

   转染 2d 后，至少 50%的细胞应该成病理症状（细胞变圆但仍然贴壁）。在包装实验中，表达 GFP 基因的复制子载体的应用可以方便的检测转染效率和迁移。

7. 用细胞刮棒将细胞刮到培养基中，转移悬液到 15ml 离心管中，用干冰/乙醇浴和 37℃水浴反复冻融 3 次。
8. 将含有细胞的离心管放置在装有冰水混合物的烧杯中，把超声探针浸入细胞悬液液面 0.5cm 处，20%输出功率处理 20s。

9. 1400g，4℃，离心 10min 后除去细胞碎片，0.45μm 针式过滤器接在 20ml 一次性注射器上过滤上清到新的 15ml 离心管。取一部分样本做滴度测试（支持方案 2），然后分离剩余的原种分成 1ml 的等份，在干冰/乙醇池中冻存，储存于－80℃（至少 6 个月）。在保存前浓缩（第 10a 和 11a 步）或纯化和浓缩（第 10b～13b 步）原种。

离心沉淀

10a. 将第 9 步中的载体溶液转至一 30ml 离心管，4℃，20 000g 离心 2h。

11a. 用小体积（如 300μl）的 10%的蔗糖溶液重悬沉淀。取出一份原种测滴度（支持方案 2），然后等量分装（如 30μl），冻存于干冰/乙醇池。储存于－80℃（至少 6 个月）。

用不连续的蔗糖梯度纯化和浓缩

10b. 在 Beckman Ultra-Clear 25mm×89mm 的离心管将如下溶液在管中分层，准备蔗糖梯度：

7ml 60% 蔗糖；

7ml 30% 蔗糖；

3ml 10% 蔗糖（上层）。

11b. 小心地将第 9 步中的载体原液加入梯度上面，4℃，10 000g 离心 2h。

12b. 从上面吸去 10%和 30%的蔗糖层，在 30%和 60% 蔗糖层之间的表面收集病毒。转移至一 Beckman Ultra-Clear 14mm × 95mm 的离心管，加入约 15ml 的 PBS，4℃，10 000g 离心 1h 以沉淀病毒颗粒。

用纤维可视镜观察时，30%和 60% 蔗糖层之间的表面可见雾状带。

13b. 用小体积（如 300μl）的 10%的蔗糖溶液重悬沉淀，等量分装（如 30μl）。冻存于干冰/乙醇池。储存于－80℃（可保持稳定至少 6 个月）。冻存前，保留一份原液测定滴度（支持方案 2）。

支持方案 1　制备用于转染的 HSV-1 黏粒 DNA

黏粒克隆保存于－80℃添加了 7% 的 DMSO 的 SOB 培养基中。

材料（标√的条目参见附录 1）

HSV-1 黏性系列 C6Δa48Δa 大肠杆菌克隆，包括黏性 6Δa，黏性 14，黏性 28，黏性 48Δa，黏性 56（图 12.8.1）

√含 50μg/ml 氨苄青霉素的 SOB 培养基（SOB/amp）

DMSO

Plasmid Maxi Kit（Qiagen），包括 Qiagen-tip 500 柱，溶液 P1、P2、P3、QBT、QC 和 QF（溶液 QF 提前预热至 65℃）

异丙醇

70%（V/V）乙醇

√TE 溶液，pH7.5

限制性内切核酸酶 *Dra* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ 和 *Pac* Ⅰ

高分子质量的 DNA 标准品（Life Technologies）

1kb DNA ladder (Life Technologies)
电泳用的琼脂糖
√TAE 电泳缓冲液
1mg/ml 溴化乙锭
√25∶24∶1 (V/V/V) 苯酚/氯仿/异戊醇
25∶1 (V/V) 氯仿/异戊醇
100%乙醇
√3mol/L 乙酸钠，pH5.5
17mm×100mm 无菌的带螺旋帽的管（如 Falcon 2059）
Sorvall GSA 和 SS-34 转子
65℃和 37℃水浴箱
250ml 的高速离心管
30ml 离心管

1. 对于 HSV-1 黏性克隆系列 C6Δa48Δa 的每个黏性克隆，准备一含有 5ml 无菌的 SOB/amp 培养基的 17mm×100mm 无菌的带螺旋帽的管。用接种环接种长期冻存的合适的黏性克隆。在 37℃摇床中孵育 8h。
2. 各转移 1ml 至一含有 300ml 无菌 SOB/amp 培养基的 2L 烧瓶中，在 37℃摇床中再孵育 12～16h。

   常常在白天预先培养 5ml，扩大培养过夜。不要超过规定的孵育次数。因为这样会增加黏粒变形的风险。同样的原因，避免菌落去除克隆。
3. 将菌液等分成 1ml 置于低温冻存管，每管加入 70μl DMSO。混匀并长期保存于 −80℃（可保存数年）。
4. 将余下的菌液在 250ml 的高速离心管中离心沉淀，4℃，4000*g* 离心 10min。
5. 倒去培养基并将离心管倒置于纸上 1～2min 以吸干所有的液体。用 15ml P1 重悬沉淀后加入 15ml P2。旋转 6 次混匀，并在室温下孵育 5min。
6. 加入 15ml P3，立即旋转 6 次混匀。将管子至于冰上孵育 20min，再次旋转离心管。4℃，16 000*g* 离心 30min。
7. 同时，将 5 个 Qiagen-tip500 的柱子分别用 10ml QBT 平衡。在重力下流干液体。在柱上标记克隆名，并用一小片 Kimwipe 膜包住。
8. 将第 6 步中的上清小心地从膜中过滤至 Qiagen-tip500 的柱中，在重力下使液体通过树脂。
9. 用 30ml 的 QC 洗柱 2 次，然后用 15ml 预热（65℃）的 QF 洗脱 DNA，液体置于一 30ml 离心管。
10. 用 0.7 倍体积 10.5ml 的异丙醇沉淀 DNA，立即以 20 000*g*，4℃离心 10min。
11. 小心移去第 10 步中的上清且不弄坏沉淀，在管壁外标记沉淀位置。用冷却的 70%的乙醇洗涤沉淀，必要的话按照第 10 步的方法再次沉淀。
12. 完全吸去上清，但是避免沉淀过干。用 200μl TE (pH7.5) 重悬沉淀，将 DNA 溶液转移至一小离心管，保存于 4℃。鉴定 DNA 后，(测定浓度和限制性内切核酸酶酶切分析，第 13～14 步)，分装成 10～50μg 保存于 −20℃ 。

13. 用紫外分光光度计测定第 12 步中的 DNA 溶液在 260nm（A_{260}）和 280nm（A_{280}）处的吸光值。

    在 A_{260} 处的值 1.0 相当于双链 DNA 50μg/ml。同时在 A_{260} 和 A_{280} 的比率可表明 DNA 的纯度。比较纯的 DNA 样品在 A_{260}/A_{280} 的值为 1.8，不要使用低于这一比率的 DNA 样品。

14. 同时可进行的反应，取第 12 步所得的黏性 DNA 2μg 用限制性内切核酸酶 *Dra* Ⅰ，*Kpn* Ⅰ 各 10U 在 37℃酶切 2h。在 TAE 电泳液中以 40V 的电压，0.4%的琼脂糖胶电泳过夜以分离片段。用高分子质量的 DNA 和 1kb DNA marker 作为分子大小标准。用溴化乙锭染色，如图 12.8.2 所示来比较酶切片段类型。（0.4%的胶很软应小心处理）。

15. 将 5 种黏性 DNA 各 10μg 组合在一小离心管中，用限制性内切核酸酶 *Pac* Ⅰ 50U 配成总体积为 100μl 在 37℃酶切 3h。用高分子质量的 DNA 和 1kb DNA marker 作为分子大小标准。通过 0.4%的琼脂糖胶电泳 1～2μl 反应混合物证实酶切完全（图 12.8.2）。

    HSV-1 在黏性 DNA 中的插入片段在唯一的 *Pac* Ⅰ 限制酶切位点侧面。用 *Pac* Ⅰ 酶切可以从黏性 DNA 的骨架（约 7kb）中释放 HSV-1 插入片段（35～40kb），它可使克隆间的同源染色体在转染时更容易重组。

16. 抽提反应混合物，首先用 100μl（1 体积）25∶24∶1（*V*/*V*/*V*）的苯酚/氯仿/异戊醇，然后用 100μl（1 体积）24∶1（*V*/*V*）的氯仿/异戊醇。加入 250μl（2.5 体积）100%乙醇和 10μl（0.1 体积）的 3mol/L 的乙酸钠（pH5.5）沉淀 DNA，－20℃孵育过夜。不要振荡，可用手指轻弹混匀以避免破坏大的 DNA 片段。

    重要提示：由于 DNA 将转染至哺乳动物细胞（基本方案），在无菌条件下处理以下操作。

17. 室温下将管子以 20 000*g* 的速率离心 10min，小心弃去上清液，用 70%的乙醇洗涤一遍。倒出乙醇，沉淀干燥 1min，用 100μl TE（pH7.5）重悬（用最小的移液枪）沉淀。

18. 按照第 13 步测量 DNA 浓度。分装成 10μg 保存于－20℃备用。

支持方案 2　扩增子的滴定

提示：滴度与每毫升的转录单位数（t.u./ml）是相关的。且不影响每毫升中的感染载体颗粒数。与转染效率相关的因素是：①用于扩增的细胞数，②调解外源基因表达的启动子，③外源基因和④检测方法的敏感性。

材料（标√的条目参见附录 1）

Vero（clone 76；ECACC ＃85020205），BHK（clone 21；ECACC ＃85011433），或 293（ATCC ＃1573）细胞

DMEM（Life Technologies）添加 10%和 2% FBS（DMEM/10%FBS 和 DMEM/2%FBS）

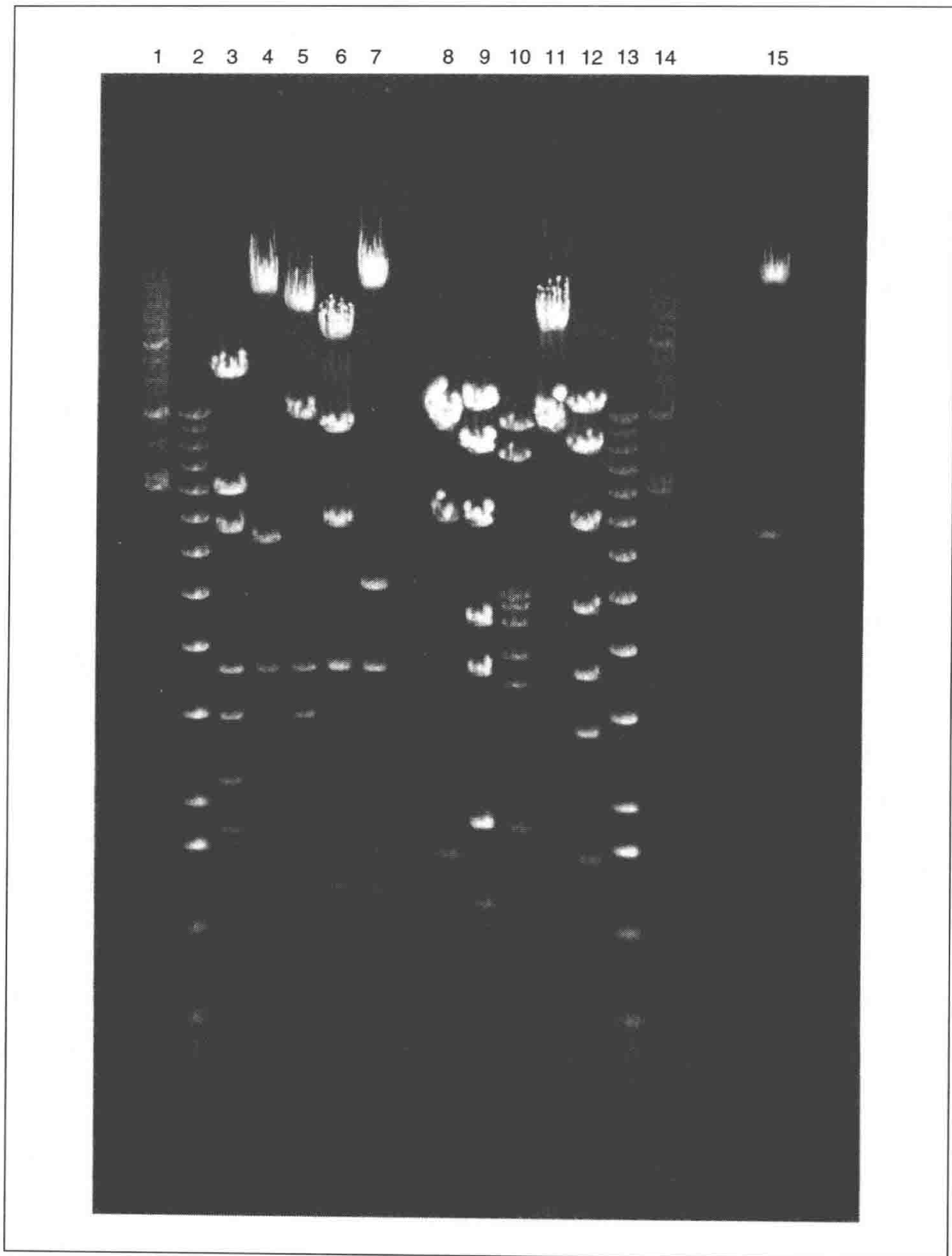


图 12.8.2　琼脂糖胶分析显示黏粒 C6Δa48Δa 克隆的限制性内切核酸酶模式。质粒单独用 *Dra* Ⅰ消化（3～7 泳道）和 *Kpn* Ⅰ消化（8～12 泳道），或混合一起后用 *Pac* Ⅰ消化（15 泳道）。反应产物是用 0.4%琼脂糖胶，TAE 电泳缓冲液，40V 电泳过夜后用溴化乙锭染色。cos6Δa，泳道 3 和 8；cos14，泳道 4 和 9；cos28，泳道 5 和 10；cos48Δa，泳道 6 和 11；cos56，泳道 7 和 12；泳道 1 和 14，大分子 DNA 标准（Life Technologies）；泳道 2 和 13，1kb DNA 梯度（Life Technologies）。

√PBS

从载体中收集来的样本（基本方案，第 9，11a 或 13b 步）

√4%（m/V）多聚甲醛溶液，pH7.0

√X-gal 染色液，GST 溶液或合适的一抗、二抗

24 孔组织培养板

潮湿的 37℃，5% CO_2 培养箱

倒置荧光显微镜

倒置光学显微镜

1. 将细胞（如 Vero76、BHK 21 或 293 细胞）按照 1.0×10^5 的密度接种于 24 孔板，加入 0.5ml DMEM/10%FBS。孵育过夜。
2. 吸去培养基，每孔均用 PBS 洗，加入 0.1μl，1μl 或 5μl 载体中收集来的样本，在 250μl DMEM/2%FBS 中稀释。
3. 孵育 1～2d，移去接种物。用 4%的多聚甲醛（pH7.0）250μl 固定细胞。用 PBS 洗涤固定的细胞 2 或 3 次，然后按照检测操作方案根据转入的外源基因观察类似绿色荧光（第 4a 步），X-gal 染色（第 4b 步）或免疫细胞化学染色（第 4c～6c 步）。

检测绿色荧光基因的表达（GFP）

4a. 用倒置荧光显微镜观察第 3 步（固定前后）中的细胞。数含绿色荧光细胞的个数，通过乘以外源基因表达细胞数和稀释倍数来确定载体的滴度。

检测表达大肠杆菌 lacZ 基因的细胞

4b. 在第 3 步中的 24 孔板中每孔加入 250μl X-gal，在 37℃下孵育 4～12h（取决于细胞类型和调节外源基因的表达的启动子）。

5b. 用 PBS 洗涤细胞 3 次终止染色反应。用倒置光学显微镜数蓝色细胞数，通过乘以外源基因表达细胞数和稀释倍数来确定载体的滴度。

通过免疫细胞化学染色的方法检测表达外源基因的细胞

4c. 在第 3 步中的 24 孔板中每孔加入 250μl GST 溶液（封闭非特异性结合位点和 permeabilize 细胞膜），室温下静置 30min。加含一抗的封闭液（用 GST 溶液稀释），4℃孵育过夜。

一抗可选的稀释范围由经验决定，一般为 1/100～1/10000。

5c. 用 PBS 洗涤细胞 3 次，每次洗 10min。加入二抗（用 GST 溶液稀释），室温下孵育至少 4h。

6c. 用 PBS 洗涤细胞 2 次，根据合适的显影操作规程显影。在倒置光学显微镜下数外源基因表达的细胞数，通过乘以外源基因表达细胞数和稀释倍数来确定载体的滴度。

结合的二抗是商业化的。有关可选的稀释倍数和显影操作规程（取决于结合反应）由抗体公司提供。

参考文献：Cunningham and Davison，1993；Pechan *et al*.，1996；Spaete and Frenkel，1982

编者：Cornel Fraefel

单元 12.9　脂质体载体用于直接体内基因转染

注意： 用于组织培养物中的细胞的脂质体转染的许多阳离子脂质体都能够购买得到。成分优化高度依赖细胞类型，而与在进行体内转染相对应组织时，典型的优化的成分不相关。所以，对于体外的转染，建议读者在说明书的指导下测试不同的商业脂质体。

基本方案　剂压成形前通过薄膜水合作用准备脂质体

剂压成形前通过薄膜水合作用是用于准备脂质体的许多方法中的一种。选择这种方法是因为它能够快速而容易地制备浓缩单相的小的单层脂质体悬液，这种脂质体适用于实验室规模的动物实验。

在准备阳离子脂质体时，DC-Chol 与 DOPE 的摩尔比为 3∶2 代表了与脂质体丛一起用于直接瘤内注射的优化的成分，而与 LPD 多聚丛脂质体一起使用的脂质体的优化的制备是由 DOTAP/cholesterol 1∶1 的比例组成的 。储存在 4℃时，这两种储存液都能在数月内保持稳定（6～12 个月），所以这两种阳离子脂质体可以在脂质体丛和多聚脂质体丛生产之前准备好。

材料（标√的条目参见附录 1）

氯仿
√2.0mg/ml DC-Chol 储存液
20.0mg/ml DOPE（1，2-dioleoyl-3-phosphatidylethanolamine）溶解在氯仿中（异丙醇极性脂体）
20.0mg/ml DOTAP（1，2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane）溶解在氯仿中（异丙醇极性脂体）
√20.0mg/ml 胆固醇储存液
√5.2%（m/V）葡萄糖
730.0ml 透紫外灯玻璃离心管
氮气桶
真空干燥器
水浴超声破碎仪
65℃水浴
LiposoFast 挤压机（avestin）
1.0μm、0.4μm 和 0.1μm 聚碳酸酯膜滤器

1. 用氯仿将 30.0ml 的透紫外灯玻璃管漂洗 3 次。
2. 混匀用于准备脂质体的在透紫外灯玻璃管中的适当的脂质。
   a. 对于 DC-Chol/DOPE 的脂质体（摩尔比 3∶2）：加入 1.07ml DC-Chol 储存液和 0.1ml DOPE 储存液，来回漩涡振荡混匀。

b. 对于 DOTAP/cholesterol 脂质体（摩尔比为 1∶1）：加入 1.0ml DOTAP 储存液和 0.55ml 胆固醇储存液，来回漩涡振荡混匀。

3. 用手旋转管子，同时通过沿着管壁吹氮气，蒸发氯仿，形成薄的脂质薄膜。
4. 在真空干燥器中干燥 2～3h，使膜完全干燥。为了避免在真空环境下脂质膜的丢失，用铝箔在管口盖住，并在铝箔上面用 26-G1/2 的针戳一些小洞。
5. 加 2.0ml 5.2%的葡萄糖溶液到膜上。
6. 旋转管子将脂质重悬直至差不多所有的脂质膜都重悬在溶液中。

   脂质可能存留在管壁上，以白色固体沉淀出现。在水浴超声破碎仪中处理几次将帮助溶解脂质到溶液中

7. 将悬液室温放置 2～3h 或者 4℃过夜，让脂质完全水合。用石蜡膜封住。在 65℃的水浴箱中加热悬液 5～10min。
8. 为了使脂质凝聚物弥散，将脂质溶液置于水浴超声破碎仪中进行超声处理直到所有的凝聚物都消失，然后放回水浴。
9. 将两个 1.0μm 聚碳酸酯膜滤器放在挤压机中，加热挤压机到 65℃，5min。
10. 通过将悬液通过挤压其 10 次，挤出脂质分散物。挤压后置水浴。

    脂质悬液压缩处理后，应该由不透明的混浊的溶液变成透明而混浊的悬液。

11. 用 0.4μm 和 0.1μm 的聚碳酸酯膜滤纸，重复第 9～10 步，从而得到小的单层的脂质体，直至为 100～200nm。将脂质体储存在 4℃（可至 12 个月）。

    这些脂质体随时可以用于与 DNA 混合用于基因转染。

参考文献：Felgner *et al.*，1987；Gao and Huang，1991，1995

编者：Mark Whitmore，Song Li，and Leaf Huang

第 13 章　基因治疗的转移系统

基因治疗是治疗人类疾病的一种策略，它是建立在将遗传物质转移到个体体细胞中的基础之上。基因转移可通过直接体内法进行，即将携带有基因的病毒载体或非病毒载体直接注射到血液或组织中；基因转移还可通过间接体内法进行，即首先在实验室将遗传物质导入到细胞中，然后将含有外源基因的细胞回输到患者体内。关于这一点，基因治疗实际上是一系列将重组 DNA 转入体细胞中的研究，同样也是将重组 DNA 技术用于人类药物研究。广义的讲，基因治疗是传统医学治疗的一个延伸，只不过在这里治疗剂是遗传物质而不是蛋白质。通过改变细胞中的遗传物质，基因治疗可以彻底地纠正疾病的病理生理。大体而言，基因转移应该适合于许多组织和疾病。它有可能治愈遗传病，而且可作为一种辅助方法治疗目前许多治疗效果不理想的疾病。然而，基因治疗仍然处于研究初期，远远未达到其治疗目的。

基因治疗包括两个重要步骤：将基因转入到合适的细胞中及基因的稳定表达。第 12 章中介绍了用于体细胞转染的载体，包括裸 DNA 和 DNA 复合体、RNA 病毒（如反转录病毒）、DNA 病毒（腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒）。每一种载体系统各有优缺点，因此转染特定的组织时应根据载体的具体特点来选择。但是没有一种载体系统适合转染所有组织，因此每一种临床应用方案应权衡每一种载体的特点。

转染基因的表达对于基因治疗的成功与否是至关重要的。尽管人们已比较清楚能在组织培养细胞中有高水平表达的 DNA 序列，但在带有人类疾病的动物模型中重组基因的表达可能完全是另外一种情况。出现的这些困难可能来自于不了解细胞抑制病毒介导的基因表达的机制、细胞表达转移基因的选择性缺点、缺乏合适的正调控序列或者其他一些未知因素。评价基因在一种特定组织中的转移和表达时一定要考虑其他一些组织。

尽管一些假设能在动物模型中得以验证，但必须认识到疾病在动物模型中和在患者中会存在表型差异，而且疾病的发病机理在不同种属中会存在差异。不管怎样，动物模型在基因治疗研究中提供了重要的桥梁作用，特别是在阐明疾病的病理生理和在临床前治疗研究的设计中。

单元 13.1 介绍了正常和病理血管的基因转移途径：导管介导的基因转移被用到了几种带有人血管疾病的动物模型中。将基因转移到骨骼肌中已被证明是一种重要的疫苗免疫的方法，另外还能应用产生重组蛋白分泌到血液循环中以治疗系统性疾病，这些操作步骤在单元 13.2 中讨论。脑的直接体内和间接体内基因转移的步骤在单元 13.3 中讨论。其中包括了转移到复杂的中枢神经组织和大脑的不同区域的特殊方法。

在单元 13.4 中介绍了一种肿瘤基因治疗技术，就是通过直接体内和间接体内的方法将编码 cytokines 或其他免疫调节蛋白的基因转移到肿瘤细胞中以刺激对基因修饰的肿瘤细胞和其他肿瘤细胞的免疫识别。造血干细胞可作为一种重要载体来治疗恶性疾病、系统性疾病，还有可能治疗艾滋病。

在单元 13.5 中介绍了利用导气管进行基因转移，其中介绍了一些应用较普遍的导

气管模式，包括原代上皮细胞、偏振导气上皮细胞、人支气管异种移植、啮齿动物肺。

单元 13.6 中介绍了肝细胞的直接体内转移的最佳方法。肝细胞的基因转移在动物模型中已证明是非常有效的，目前正在评价其在许多代谢类疾病临床实验中的效果。在啮齿动物中，单独从尾静脉注射的腺病毒载体就能转导到大量的肝细胞中。这为评价所设计的载体提供了一个便利的模式，包括评价特定的转基因在带有人类疾病的小鼠模型中的效果。

编者：Anthony Rosenzweig and Elizabeth G. Nabel

单元 13.1　动脉的基因转移

策略设计

利用这一单元的操作方案，可采用外科手术的方法直接将载体（病毒或非病毒）或已转导基因的内皮细胞或平滑肌细胞注入到正常的或已损伤的动脉中。选择动脉基因转移需要考虑：动物种类的选择、动脉的位置、载体（包括调控序列）、手术方法的选择以及选择损伤的动脉还是没有损伤的动脉。在本节所介绍的方法适合于病毒和非病毒载体的转移；第一个操作方案能用于转移已稳定转染了基因的内皮细胞和平滑肌细胞。

对于每一个载体和动物模型来说，优化基因转移是很有必要的。有许多参数需要优化，如载体的浓度和滴度、滴注的时间和压力、导管的选择、适当的分支连接、血管损伤的程度。这些参数都需要利用带有报告基因的载体来摸索和优化，然后再来评价带有生物活性基因的载体。在优化过程中，应该评估出 DNA 和病毒载体数量的范围。通常情况下，DNA 的量在 1～1000μg，而 109～1010pfu/ml 的腺病毒载体可作为一个起始点。用于动脉基因转移的报告基因有 hpAP（人胚胎碱性磷酸酶，热稳定）、*LacZ*（大肠杆菌 β 半乳糖苷酶）、CAT（氯霉素乙酰转移酶）、萤光素酶。需要注意的是，必须消除在动脉组织中 hpAP 和 *LacZ* 的背景信号。为了评估出最佳的基因表达，无论是病毒载体还是非病毒载体，比较适合的时间是在转移后 2～5d 处死动物。基因表达可通过组织化学（hpAP，*LacZ*）、免疫组织化学或生物化学（CAT，萤光素酶）、萤光素酶的方法进行检测。

基因转移的那一天，载体和细胞的最终准备必须在滴入动脉之前 10～15min 之内进行，包括制备 DNA 脂质体复合物的制备、腺病毒载体的稀释以及从组织培养板中移出已转染的细胞。

注意：所有的实验设计包括活体动物必须遵守国立卫生研究院和研究机构或者大学的标准，而且由专门的动物饲养和使用机构同意。

注意：所有的手术器械必须消毒，所有的操作必须在无菌室里进行无菌操作，除非有其他的规则。

基本方案 1　通过手术将基因转移到猪的动脉

猪髂股的动脉在实验中是很有用的，因为其比较容易进入，而且在大小和结构上与

人的很相近。为了对同一个动物的左右动脉进行转染，麻醉的时间可以通过在进行第一根髂股动脉滴注 20min 确定。准备第二根髂股动脉和插入第二根导管。

材料（标√的条目参见附录 1）

幼年家猪性别任意（3 个月大小，15～25kg）
阿斯匹林
Telazol
甲苯噻嗪（xylazine）
1%异氟烷（isoflurane）
√无菌的磷酸盐缓冲溶液（PBS）
病毒或非病毒的包含编码重组基因的载体（第 12 章）或者已转染的内皮或平滑肌细胞悬液（每个动脉 0.8ml）
为导入麻醉用的 1%异氟烷而准备的气管专用的导管（适合猪用的）和器械
标准的手术器械
Balfour 牵引器
2-0 的丝带
两个气囊导管（一根动脉一根导管）
压力牵引器和血液动力的监护仪
1-0 可吸收的缝线
皮肤锁环（如不锈钢制的关闭伤口的小手术夹）

1. 在手术前 2 天，给幼年家猪按 10mg /kg 体重的剂量服用阿斯匹林，并且在整个研究过程中每周一次连续服用 3 次。
2. 按每公斤 6.0mg Telazol 和 2.2mg 甲苯噻嗪（xylazine）的量给家猪进行肌肉注射来麻醉，然后插入一根导管，用 1%异氟烷（isoflurane）来麻醉，直到整个手术完成。
3. 将实验用的家猪准备好，然后用一块布将其盖住，划一条中位线，从它的腹部切开，一直延伸到耻骨。就这样，把猪的表皮和筋膜沿中线切开了。如果是母猪的话，要避免切到它的尿道。从中打开一个空洞，小心地使用牵引器将它的肠放入体内。
4. 用各种各样的器械，将从其头盖骨附近到大腿骨的的动脉血管分离出来。小心地将血管附近的淋巴和附近黏附的组织分开。从水平的角度将血管分离，以避免切到旁边的支血管。
5. 小心分离后，用 2-0 的丝线将分支血管绑好。如果不这样的话，会降低血管中的血压，以至于影响到基因的转移。
6. 把髂骨的尾部用 2-0 的丝绳绑好，用一把精致的剪刀在髂骨的动脉切一个口子，小心地用剪刀将血管扩张，插入一对气囊导管（图 13.1.1）。

   第 7～9 步是为了诱导血管手术的进行，如果是转基因到普通的血管，直接跳到第 10 步

7. 通过目视镜，进一步地将导管接近气囊的尾部。这个操作需要通过微小的牵引将导管变直。

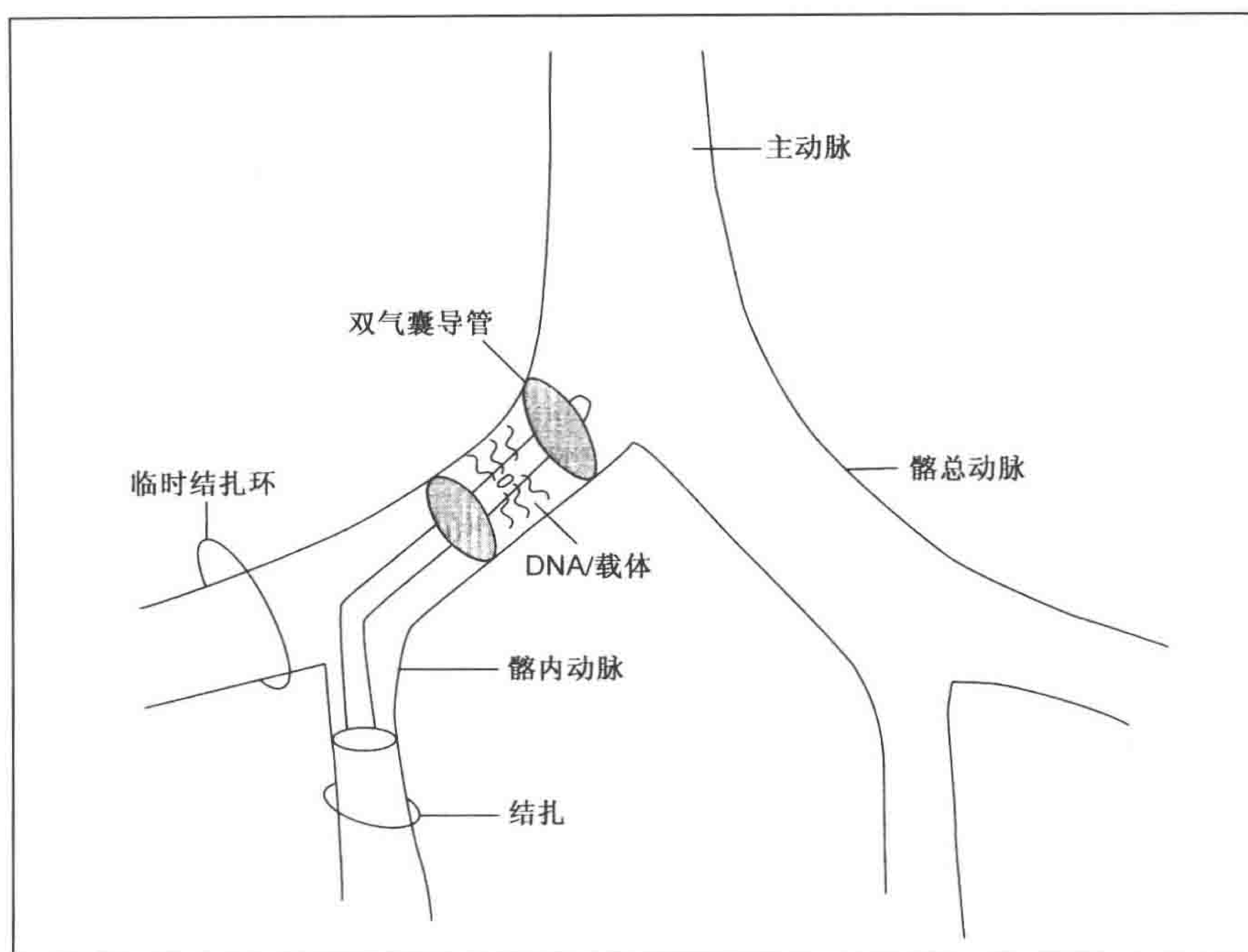


图 13.1.1　猪髂动脉中的基因转染。通过动脉切开术双气囊导管插入到髂内动脉，延伸到总髂动脉。随着进一步的插入导管，末端球产生泡沫化损伤，随着进一步插入，球就跨越了损伤区域。随后释放基因载体。

8. 把管内无菌 PBS 装在压力转换器中，将它的压力调为 0 并且与球的尾部相连接。按 1cc/1～5min 的速率在球中不断地充气（缓慢的充气是为了保护受伤的地方。这时压力表的压力大约为 500mmHg。
9. 导管的中部，两个气囊跨过受伤的血管的地方，将导管慢慢地缩小。
10. 在气囊的尾部充入 1cc 的空气，加入 3～5ml 的无菌 PBS，将血液冲走。
11. 在导管（0.8ml）中加满病毒或非病毒的载体液体或者转入基因的细胞混悬液。
12. 在气囊中充入 1ml 的空气。
13. 在两个气囊之间（0.1～0.3ml）血管的伤口处的区域滴满悬液，测量滴入时的压力，不要超过 150mmHg（猪的血压是 901mmHg）。整个滴入过程为 20min，其间要控制住压力。
14. 从近到远，对气囊放气。把导管移开，并用 2-0 的丝绳绑好髂骨的动脉。确保血液的流动正常。
15. 用 1-0 可吸收的缝线将猪的血管和肌肉缝合，再将筋膜缝合，最后将表皮缝合。

基本方案 2　通过手术将基因转移到猪的髂骨动脉

材料

3.5mm 的硝酸纤维素材料的带有支架的可促使血管球的导管（7 个细胞，16mm 支架）

1. 和基本方案 1 的第 1～6 步一样将猪的血管分开。
2. 通过支架插入一个 3.5mm 的硝酸纤维素材料的带有支架的可促使血管球的导管，渐渐地后退以促使它接近大腿骨的的动脉（图 13.1.2）。然后用 8 个大气压的压力扩张 30s。

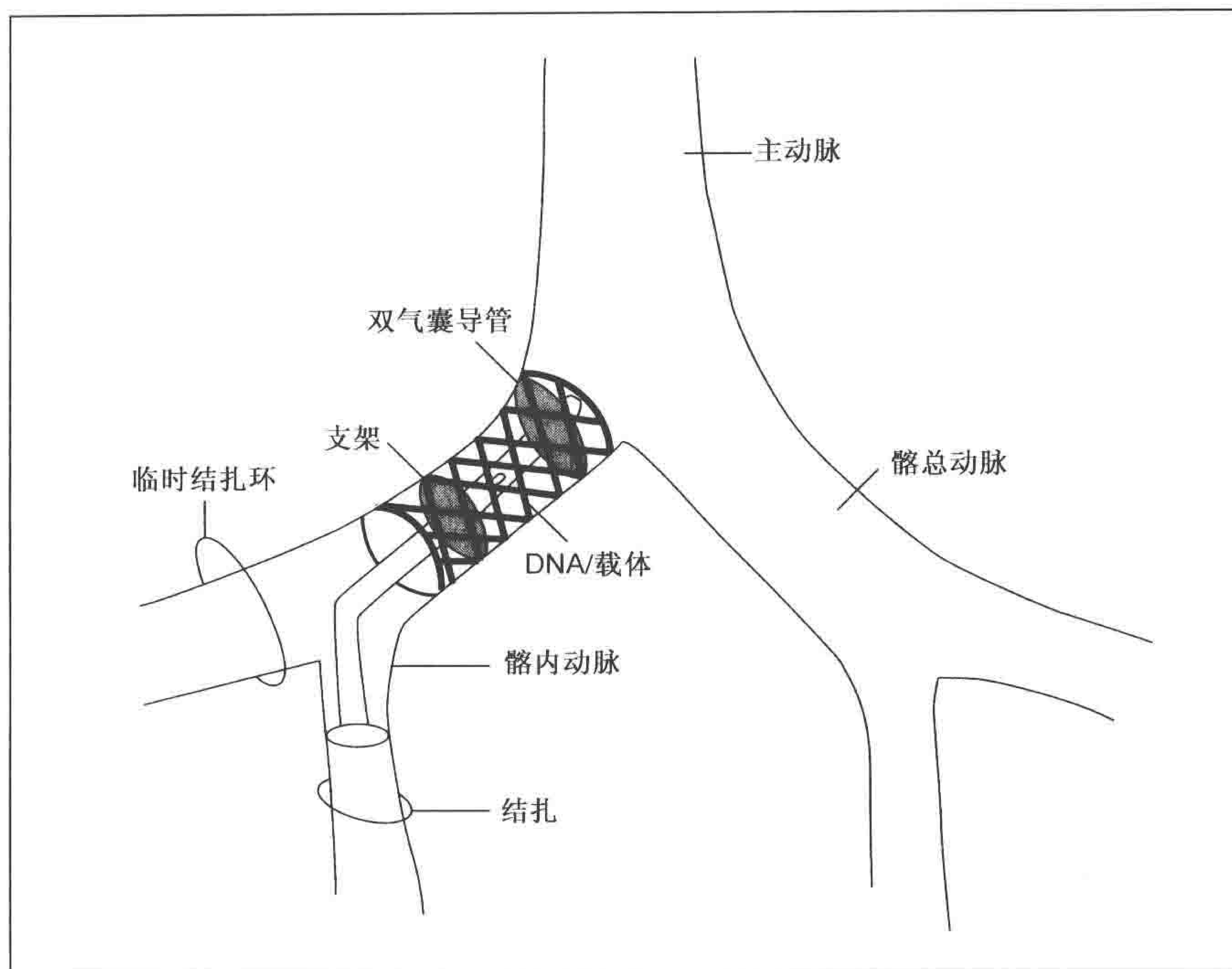


图 13.1.2　猪支架髂动脉基因转染。带有支架的血管形成双气囊导管接合器被插入动脉切开术的髂内动脉，延伸到总动脉。随后支架展开，基因载体通过双气囊导管释放出来。

3. 插入一对囊装导管在血管的支架上面，移到两个球囊跨过受伤的血管的地方的中部。球囊和动脉的比例为 1.1∶1.0。在治疗的过程中，不要将髂骨动脉绑上。
4. 在球囊充入 1cc 的空气。在两个球囊之间的 0.1～0.3ml 的距离用无菌的 PBS 冲洗。使球囊的尾部膨胀，控制压力在 150mmHg，然后慢慢加入 500ml 病毒或非病毒的悬液，时间控制在 20min 以上。
5. 从近到远，对气囊放气。把导管移开，并用 2-0 的丝绳绑好髂骨的动脉。确保血液的流动正常。
6. 和基本方案 1 的第 15 步一样，缝合猪的血管、肌肉、筋膜和表皮。

基本方案 3　通过手术将基因转移到兔子的动脉粥样硬化的动脉

对兔子的基因转移的实验是在其一根髂骨动脉上进行，以减少它的四肢的缺血。

材料

白色的新西兰兔（3～4kg），无论雄雌

阿司匹林
氯胺酮
甲苯噻嗪（xylazine）
1%异氟烷（isoflurane）
含 0.5%的胆固醇（cholesterol）/2.3%花生油（peanut oil）的兔食
10U/ml 的肝素（抗凝血药）（heparin）
√无菌的磷酸盐缓冲溶液（PBS）
病毒或非病毒的包含编码重组基因的载体（0.7ml；第 12 章）
为导入麻醉用的 1%异氟烷而准备的气管专用的导管（适合兔子用的）和器械
标准的手术器械
2-0 和 4-0 的丝线
3F 的球囊导管
2-0 的缝线
兔子的颈圈
Balfour 牵引器
手术刀片
人用血管成形的球囊导管
压力计和血压计
5-0 的缝线
1-0 可吸收的缝线

1. 在手术前 2 天，给白色的新西兰兔按 10mg /kg 体重的剂量服用阿司匹林，并且在整个研究过程中每周一次连续服用 3 次。
2. 按每千克 13mg 氯胺酮和 5mg 的甲苯噻嗪（xylazine）量给兔子进行肌肉注射以麻醉，然后插入一根导管，用 1%异氟烷（isoflurane）来麻醉，直到整个手术完成。
3. 通过手术使兔子的膝盖以上，股骨以下的部位暴露。把尾部用 2-0 的丝线绑好，就近绑成环状。在丝线节扎出附近的动脉上开一个口子，并且插入一个放了气的 3F 的球囊导管，大概插入 10～15ml 的深度。
4. 给 3F 的球囊导管充气并且慢慢地缩回导管，可以感觉到一些来自导管的阻力。当导管到达所要的动脉切开的位置的时候，放掉导管中的气体，再重复该过程 2 次。最后一次缩回导管的时候，解开先前绑的环。
5. 用 2-0 PDS 的线将兔子的肌肉和表皮缝合好，为了不让兔子咬掉这些线，在它的脖子上系上颈圈。
6. 在手术后，给兔子喂含 0.5%的胆固醇/2.3%花生油的兔食，持续 3 周。在兔子喂食的前后测量兔血清中的胆固醇和甘油三酯的含量，预计中喂食前后的胆固醇为(54±4) mg/dl 和（1107±44）mg/dl，甘油三酯为（36±1）mg/dl 和（218±15）mg/dl。
7. 如第 2 步一样，对兔子进行麻醉，将实验用的兔子准备好，然后用一块布将其盖住，划一条中位线，从它的腹部切开，一直延伸到耻骨。就这样，把猪的表皮和筋膜沿中线切开了。从中打开一个空洞，小心地使用牵引器将它的肠放入体内。

8. 用各种各样的器械，将从其头盖骨附近到大腿骨的的动脉血管分离出来。小心地将血管附近的淋巴和附近黏附的组织分开。从水平的角度将血管分离，以避免切到旁边的支血管。
9. 小心分离后，用 2-0 的丝线，将分支血管绑好。如果不这样的话，会降低血管中的血压，以至于影响到基因的转移。
10. 通过静脉注射，按每公斤 20U 的量，注射肝素。在主动脉的尾部，每一个髂骨血管的分支处和损伤的动脉粥样硬化的尾部绕成环状。暂时牢固地系住主动脉和没受伤的动脉。

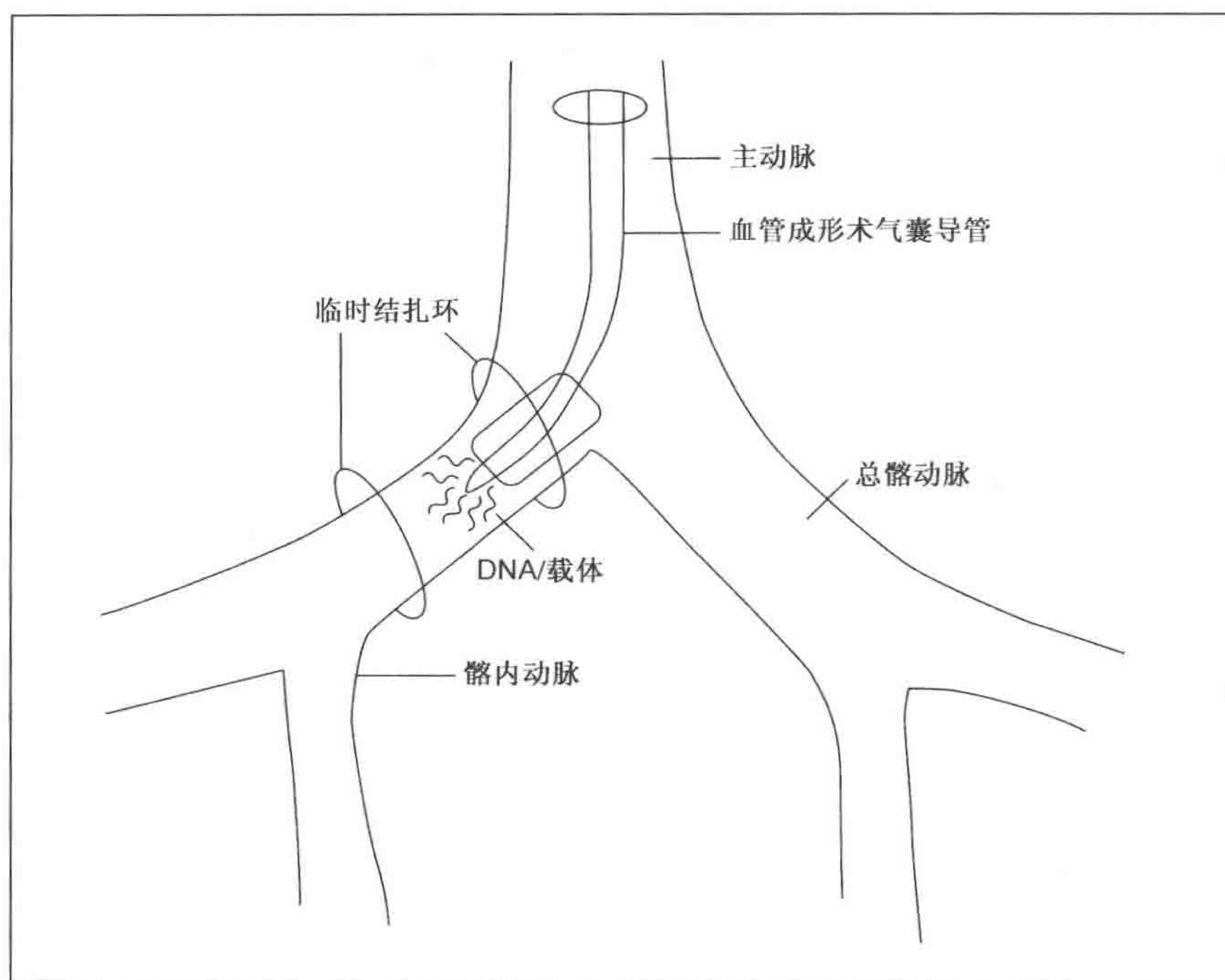


图 13.1.3　兔子髂动脉中的基因转染。动脉切开术将血管成形术气囊导管插入主动脉中，深入到髂骨动脉。随后能显示球损伤导管的部位，基因载体就释放到了独立的动脉区段中。

11. 用手术刀在动脉处切出一个口子，在动脉里插入一个人用血管成形的球囊导管，使其接近动脉粥样硬化的位置（图 13.1.3），用一根更大的囊球到达一个更加深入的位置。
12. 对血管成形的囊球按固定的压力充气 60s。放气并且重复 2 次。每次不同的放气和压力使它进入更深的地方。
13. 收缩囊球到一个可以使导管尾部的尖端进入受伤的区域，并且位于髂骨的附近便于输入载体。
14. 按固定的压力（1～2atm）给囊球导管充气。暂时将导管固牢。加入 3～5ml 的无菌 PBS，以将血液冲走. 在导管中加入 0.7ml 的病毒或非病毒的载体液体或者转入基因的细胞混悬液。注意切口尾部的安全。

15. 在两个球囊之间（0.1～0.3ml）血管的伤口处的区域滴满悬液，测量滴入时的压力，不要超过 150mmHg。整个滴入过程为 20min，其间要控制住压力。
16. 先松开远端绳子，然后松开临近的绳子，检查松开之后动脉血的流动是否恢复。如果血流没有恢复，则在没有损伤的髂骨动脉和主动脉注入肝素，然后将一个逆行清除管通过主动脉，从而使在这个上面步骤中形成的血栓破裂被清除。
17. 将气导管拿出并结扎，用 5-0 线缝合。用 2-0 线连续缝合腹膜和肌肉。用 2-0 间断缝合线缝合筋膜。用 2-0 简便缝合线缝合皮肤。

基本方案 4　用外科方法将基因转入到颈动脉

颈动脉的解剖学位置允许基因转入是临时停止血液的流动，这时双侧的动脉将防止局部缺血。血流可以通过一个顺行的方式继续，这种方式可以是通过一个被转导的动脉或者是进入这个被转导的动脉而不通过它。

材料

成年 C57B1/6 小鼠（25～35g）
氯胺酮
甲苯噻嗪
普通盐水
乳酸盐保护液（Baxter Healthcare）
编码重组基因的重组病毒或非病毒载体溶液（每根动脉 10μl；第 12 章）
M-199 培养基（invitrogen Life Technologies），只用于重新获得常规的颈动脉流
恩氟沙星（贝螺杀）
25 和 33G 注射器
外科显微切割显微镜
外科手术刀片，No. 15
Agricola 显微切割牵引机
便携灼烧装置
26mm 直的微血管夹毛细血管磁夹（Roboz 外科装置）
6-0 丝缝合线
显微注射器
7-0prolene sutures，用于通过常规颈动脉血流重获时
显微切割剪，用于通过常规颈动脉血流重获时
硅酮插入导管
8-0 vicryl sutures
Nexabond 经典皮肤复合系统
温暖的小鼠笼

1. 用 25G 的注射器通过肌肉注射麻醉一只成年的 C57B1/6 小鼠，每千克 80mg 氯胺酮和 12mg 甲苯噻嗪。准备好将小鼠盖上布单，将小鼠仰卧放置在显微切割显微镜下确保能看得足够清楚。

2. 在前部靠颈部的正中位置做一条线，用一把15号的手术刀从环状软骨切开一直切到垂管。切开strap肌肉并用Agricola显微切割拉伸机横向拉开。通过这样的切割，用钝圆的解剖方法将动脉管分开，保护迷走神经和喉部的回归神经。
3. 电凝小的旁边的分支，如果有的话，在离主动脉至少1mm的地方放一个可移动的灼烧装置。不时地用普通盐水使周围组织湿润。如果不结扎所有的旁边的分支将导致载体溶液漏出，这可能会降低转基因表达。

对于颈总动脉注射

4a. 用一个26mm的Schwarz微管直夹在分叉处的近侧7～8mm处夹住颈总动脉。用另外一个微管夹在分叉处的远端2～3mm处从内外两侧夹住颈总动脉。
5a. 用一个6-0的丝质缝合线在颈总动脉的近侧1mm处环绕，打一个顺的小结。
6a. 用一个33G的针头在颈总动脉的分叉处近侧1mm位置穿刺。用沾过乳酸盐保护溶液的棉签轻轻地挤压动脉使血液从穿刺口放出来。
7a. 在颈动脉的穿刺位置重新插入一个33G的针头，针头连在一个装有10μl病毒或非病毒载体溶液的显微注射吸管上。将溶液轻轻地慢慢地注入到血管中。
8a. 拉紧开始放置的6-0丝质缝合线同时拨出针头（缝合线和穿刺应该是在同一个位置这样拉紧缝合线可以封住穿刺口）。20min后再来处理注入了载体溶液的血管。
9a. 去掉双侧的夹子让血流重新流动到绑住的颈动脉的远端。进入到第10步。

对于流过颈总动脉的情况

4b. 用一个26mm的Schwarz微管直夹在分叉处的近侧7～8mm处夹住颈总动脉。用一个7-0 prolenne缝合线在颈分叉远侧处堵塞。用一个7-0 prolenne缝合线在颈总动脉分叉远端2～3mm处堵塞外侧颈总动脉。
5b. 用显微解剖剪在动脉近段外侧实施动脉切割。在近段外侧的切开位置插入一根二甲硅油导管并将导管近段分叉方向推动1mm。注射20～20μl的M-199中介液冲洗这个区段的血液，然后拿出导管。
6b. 将另外一根连到显微注射吸管的导管插入，穿过切开位置在靠近分支的远端插入颈总动脉，显微吸管的尖端充满了病毒或非病毒载体。用一个刚好放置在切开位置远端的结来固定导管的尖端（这样将颈总动脉一段3～4mm的部分分离开）。输入4～5μl的载体溶液到颈总动脉。让动脉膨胀20min。
7b. 将载体溶液吸回到吸管然后将导管撤离。短时间地松开在颈总动脉上的夹子让残留在切开部分的载体溶液被冲走。
8b. 将用来固定导管的结往近段移动，然后将外侧颈动脉在其原始位置打结。
9b. 松开内侧颈动脉的结和颈总动脉上的结使血流恢复。
10. 用8-0连续性的可吸收材料的缝合线将皮下筋膜层缝合。用经典的皮肤缝合系统或者6-0可吸收材料缝合线缝合皮肤。
11. 术后皮下给药恩氟沙星（2.5mg/kg）和乳酸盐的保护溶液。让老鼠在温暖的笼子里恢复。

基本方案5　用外科方法将基因注射到受伤小鼠股动脉

报告基因的表达将在投递后的三天观察到，而治疗学上的基因投递在小鼠受伤后4

个星期仍能被用来分析。

材料

肝素
8 个星期大的 C57B1/6 小鼠（25～30g，不论性别）
甲苯噻嗪
氯胺酮
重组病毒或非病毒载体溶液
37℃培养板
解剖显微镜（如 6～25 倍的解剖显微镜 WILD M650，WILD heerbrugg）
标准外科设备
导线
好的塑料管（0.010-in. i. d.，0.012-in. o. d.；VWR）
6-0 丝结（ethicon）
自动注射设备（如 55-1111 模型；Harvard Apparatus）
压力传感器和血液动力学的监测器
皮肤用 U 形针（不锈钢制的关闭伤口的小手术夹 9mm，Becton Dickinson）

1. 按每千克 100U 量的药物通过尾部静脉注射给 8 个星期大的 C57B1/6 小鼠。体重每千克 5mg 的甲苯噻嗪和体重每公斤 80mg 的氯胺酮麻醉小鼠。将一个 37℃的温暖的盘子放到解剖显微镜下，并将老鼠仰放在盘子上，用胶带将其四肢固定。
2. 在大腿的前外侧纵向剪开，使左侧的股动脉和隐动脉露出。在隐动脉导入一根可弯曲的导管然后穿透到股动脉约 1.5cm 处（图 13.1.4）。
3. 旋转并将线通过血管 3 次，然后将其去除。插入一根里面装有病毒或非病毒载体溶液的塑料管到损伤的动脉中。用一个 6-0 丝结暂时封闭股动脉近心端。
4. 用 10U/ml 的肝素冲洗伤口端然后用 6-0 丝结将静脉远端打结。
5. 用一个自动注射装置通过塑料管注射 0.3ml 载体溶液，注射 15min，在注射过程中用一个压力感应器调节压力在 100～150mmHg。
6. 松开近端的结让血液流动。拿走塑料管在远端打结。检查动脉血是否流动。U 形针关闭。
7. 在手术后的一天通过尾部静脉注射按每公斤体重 100U 给药。

参考文献：Akyürek *et al.*，2000；Chang *et al.*，1995

编者：Levent M. Akyürek，Ripudamanjit Singh，Hong San，Elizabeth G. Nabel，and Robert D. Simari

单元 13.2 基因传递到肌肉

对于逆病毒转导的肌肉细胞或者 DNA 疫苗肌肉都是很好的打靶位置。这两种方法我们都在这里进行描述。

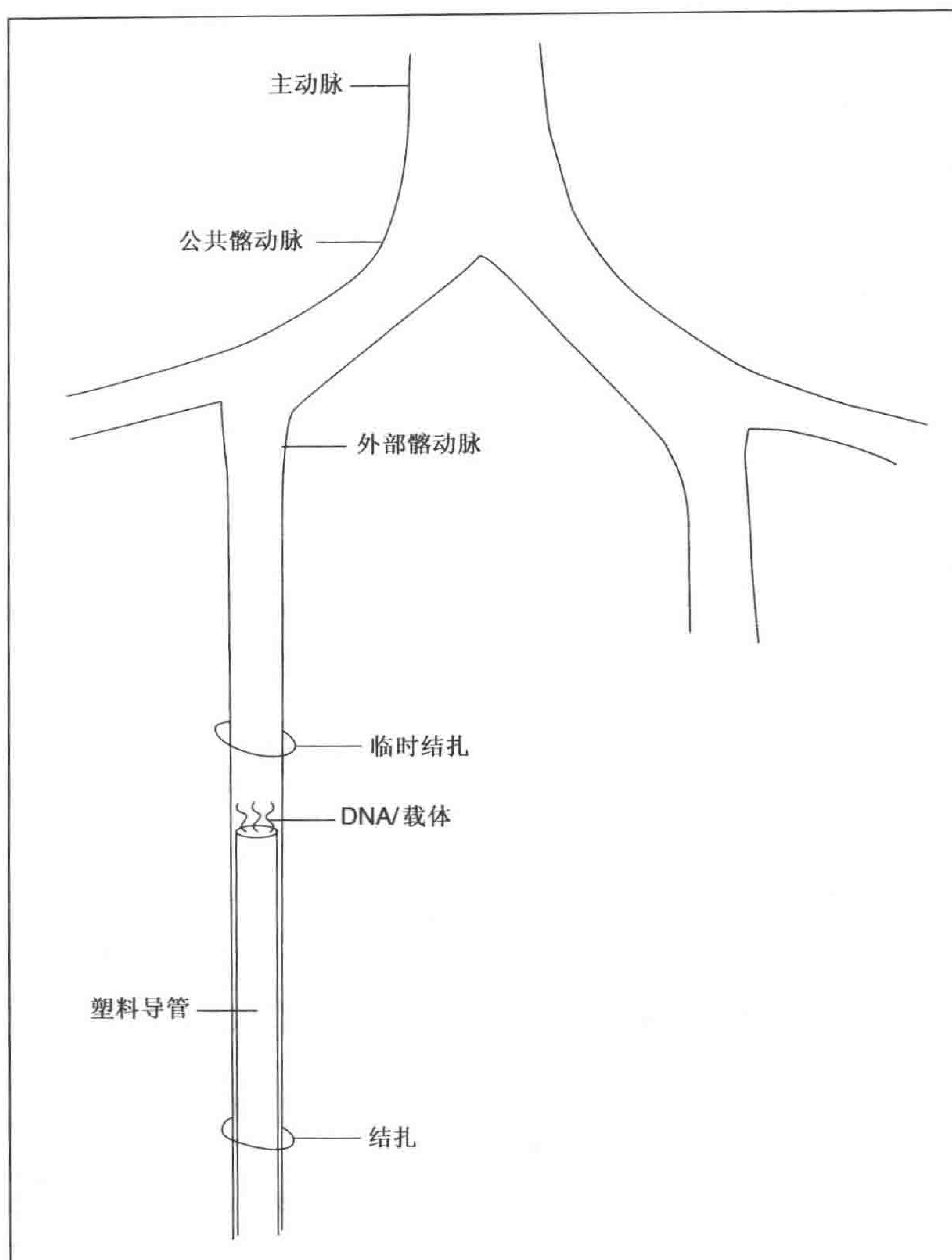


图 13.1.4　小鼠股骨动脉中基因的转移。通过隐动脉切开术插入塑料导管，再推进到股骨动脉。随着导管的损伤，基因载体被注入到分离的动脉部分。

注意： 所有涉及动物的实验方法必须遵守国立卫生研究院还有研究所或者大学的指导，还应该被动物使用和保护委员会认可。

注意： 所有与细胞相关的溶液和器具都必须是无菌的，合适的灭菌技术应该被相应的采用。在没有其他特殊要求的情况下所有的培养过程都要求在37℃，二氧化碳浓度为5%的增湿培养箱中。

基本方案1　小鼠肌肉原代细胞的分离和生长（没有细胞分类）

原代肌肉细胞能从任何年龄的小鼠身上分离出来，但是从新生的小鼠身上分离将会有更高的产量。

材料（标√的条目参见附录1）

新生的小鼠，最好是刚出生1～3d
70%的乙醇，装在喷壶里
√PBS，灭菌
√胶原蛋白酶/分散酶/氯化钙溶液
√F-10肌肉原代细胞培养基
√F-10/DMEM肌肉原代细胞培养基
√分化培养基（选择性的）
用于断头术的器具或者是用于二氧化碳吸入的装置
锋利的弯手术剪，灭菌
组织培养板
灭菌的剃刀刀片
80μm孔大的尼龙网（如Nitex；Tetko）和灭菌的漏斗，选用
桌面离心机
√35mm、60mm、100mm和150mm胶原包被的组织培养板
带相位光轴的倒置显微镜

1. 用断头术或者二氧化碳吸入法处死1～5只新生小鼠。
2. 用70%的乙醇冲洗四肢，并用锋利的弯手术剪切下来。在立体解剖显微镜下工作，用钳状骨针将肌肉从皮肤和骨头上切下来。如果四肢都成功地切下来，将肌肉组织存放在一个的组织培养板中，滴上灭菌PBS，确保这些累计的组织的无菌性。
3. 加足够量的PBS保持组织湿润然后用剃刀在培养板中将其切碎成肉泥。然后加胶原蛋白酶/分散酶/氯化钙溶液，按每克2ml的量加入（对于1～5pups的量加0.5ml），继续切割几分钟。以上操作和接下来的步骤都在灭菌的组织培养罩上进行。
4. 将切碎的组织转移到一个灭菌管中，在37℃的环境中培养直到混合物成了混合的较好的浆状（一般是20min）。在培养的过程中用一个塑料吸管轻轻地捣几次，以将成团的组织捣碎。
5. 选做：将肉泥通过一个放在灭菌的漏斗里的尼龙网以滤除大片状的组织。这一步不是必须的，在接下来两天的培养过程中更多的细胞也许会从组织上脱离下来。
6. 室温下350g，将细胞离心5min。去上清并加2～4ml（量的多少取决于正在处理的组织的量的大小）F-10肌肉原代细胞培养基。并植入到35mm，60mm胶原包被的组织培养板。
7. 培养，每2天换一次F-10肌肉原代细胞培养基并在带相位光轴的倒置显微镜下观察。不要将细胞在同一个培养板中培养多于5d，这忽视了度。不要让细胞在小于10%的融合度的情况下生长也不要让细胞长得过密，因为细胞可能会开始分化或者死亡。小于1∶5的比例稀释分离。
8. 当细胞可以分离的时候，将培养基从培养板上抽洗掉，用室温PBS冲洗以便使少量的PBS残留在板上，然后用横向的拍打姿势对准板的上边缘剧烈地拍打板的垂直边缘以使细胞脱落。在细胞从塑料板上敲下来之前有必要在PBS溶液中培养几分钟。

不要用胰蛋白酶或者 EDTA。

9. 将细胞移重新植到一个新的胶原包被的组织培养板中，培养 15min。使板中的液体漩动，然后将板倾斜朝向吸管的一边，将板来回地碰撞以使在洗走细胞的时候保持细胞在悬浮状态。将重悬的细胞转移到另外一个新的胶原包被的组织培养板。
10. 重复第 8～9 步，这在培养扩大开始的几个星期或者直到获得成纤维细胞（很平整的细胞）之前是必要的，留下成肌细胞（致密的直径很小的细胞）。用 F-10/DMEM 肌肉原代细胞培养基而不是 F-10 肌肉原代细胞培养基继续培养。每 3 天而不是每两天更换培养基，但是避免细胞的过分生长。及时观察细胞确保成纤维细胞变化不明显。

    原代肌肉细胞能够用标准的细胞培养方法冻存（附录 3）。生长了一个星期后，成纤维细胞通常会通过一个危机时期，这个时期中相当明显数目的细胞将死亡。剩下来的成纤维细胞将重新生长。

11. 在融合度为 50%～70%的成纤维细胞培养板中更换培养基，用分化培养基代替。重新培养，每天更换培养基。用带相位光轴的倒置显微镜观察是否出现多核肌管，多核肌管在数天到一周内应该是很明显的。在分化培养基一个星期后，有时会观察到肌管偶尔颤搐，因为收缩装置聚合了。

备选方案 1　使用细胞分选法纯化初级成肌细胞

使用细胞分选技术可以把成肌细胞从混合培养的细胞群种分离出来。这种分离方法可以用来分离人和鼠的初级成肌细胞，对于人源成肌细胞，从 prior enzymatic 消化来的混合细胞群带有 5.1H11 抗体，可识别人神经细胞黏附因子。这些抗体可被当成来自 DSHB 的杂种瘤细胞。把这些细胞浮在未稀释的杂种瘤细胞上层孵育 20min，然后置于 7μg/ml 的 biotinylated anti-mouse IgG（Vector laboratories）20min，并置于 10μg/ml 的 Texas Redavidin（Molecular Probes）20min，以上全部在室温中进行。

然后，这些细胞可适用于荧光分选法分选（FACS）stained 成肌细胞。通过 CA5.5 抗体和 mouse α7-integrin（Blanco-Bose *et al.*，2001）反应，FACS 和磁性分选都可被用于分选初级成肌细胞。这种抗体可以从马鲛的腹水中获得，也许使用 G 蛋白柱状纯化可以得到可重复的结果。

基本方案 2　反转录酶病毒感染初级成肌细胞

用多种病毒转染细胞，多次连续感染可以达到目的。一个细胞可以被多种病毒感染，但随着连续的暴露感染效率会降低。因此，如果一种病毒带有可选基因而另一种病毒没有，这些细胞就可被多次感染，直到 nonselectable virus 的感染率大于 99%。之后应用 selectable virus 再感染一次后分选它们。

材料（标√的条目参见附录 1）

培养基中的主要成肌细胞（见基本方案 1）
√以 F-10/DMEM 为主要的成肌细胞生长培养基
√6 孔板或 60mm 有胶原涂层的组织培养板

筛选逆转录病毒上清（单元 12.4），要求新鲜或冷冻在－80℃的

800μg/ml 溴化己二甲铵（肝素拮抗药）

配备了微量培养板离心架的台式离心机（如 Beckman 的有 GH-3.7 转子的 GPR），32℃

1. 在 37℃，5% CO_2，F-10/DMEM-based 初级成肌细胞培养基中，用 6 孔或者 60mm 胶原质包被的培养皿培养初级成肌细胞直到细胞汇合度约为 10%（基本方案 1）。细胞在感染时应该为圆的状态。确定细胞有生长 2～3d 的足够空间，但不要铺的太稀，那样他们生长不好。
2. 用 800μg/ml Polybrene 表面补充未稀释的反转录酶病毒达到最终浓度为 8μg/ml。将被感染细胞的培养基弃去，加入病毒上清液。将细胞放回培养箱中约 15min 平衡 CO_2，然后将皿小心地包在 Parafilm 里。
3. 1100g，32℃离心 30min。弃去病毒上清液，加入 F-10/DMEM-based 初级培养基，并将皿放回至培养箱中。
4. 用新的病毒上清液重复第 2～3 步，每次 8h，尽量多的次数。

   在一次感染之后，感染效率开始为 60%～90%；4 次感染之后很快达到 100%。
5. 可选的：如果病毒带的 *lacZ* 受体基因被用了，通过 FACS 分选准备高表达的 *lacZ* 分组细胞（支持方案）。

基本方案 3　成肌细胞移植到骨骼肌细胞

此步操作包括作者麻醉鼠的条件，但是任何一个标准的麻醉方法都是可以的。Metofane 不再在美国生产，但是澳大利亚的制药车间的 Metofane 也是可以的。Influrane 是另一个选择，可做为注射的麻醉剂，如 pentobarbital 或者 Avertin。

最好避免抑制免疫反应，但是当移植异源细胞或细胞产生异种蛋白的时候可能是必须的。移植缺乏抑制免疫反应的未知性别的同源细胞只用雄性小鼠。

材料（标√的条目参见附录 1）

需要进行注射的经反转录病毒转染的成肌细胞（见基本方案 2），筛选出高表达的（可选择的；见引用的相关支持文献）

√以 F-10/DMEM 为主要的成肌细胞生长培养基

√灭菌的 PBS

0.5%经灭菌的加入 PBS 中的 BSA（*m/V*）

甲氧氟烷（二氟二氯乙基甲醚）

小鼠，如果需要经免疫抑制处理

喷壶中 70%（*V/V*）乙醇

台式离心机（如 IEC HN-SⅡ型号）

纱布或棉布

有网格或分压器的玻璃房间或商用吸入室

电动剪或锋利有齿的手术剪刀

穗冲压，可选

去掉针头的50μl Hamilton注射器

有寝具或纸巾的小鼠笼

1. 通过反转录酶病毒转染成肌细胞（基本方案2）48h，在移植前给细胞每12～24h换液。
2. 酶消化反转录酶病毒转染的成肌细胞并重悬于10ml F-10/DMEM-based初级成肌细胞培养基。细胞计数。
3. 350g室温离心4min，去上清，用5ml PBS重悬，再次离心，用1ml PBS重悬并转移至1.5ml的小离心管中，4500r/min离心30s，去上清液，并以10^8个细胞/ml的浓度用0.5% BSA/PBS重悬，用移液枪吹散混匀。如果有许多小鼠要注射，请在1h内完成。

4a. inhalation cone的使用。通过挤压一弄皱了的lint-free棉纸到一个50ml圆锥螺旋拧盖的聚丙烯管做成一个Metofane吸入圆锥通风橱，添加几滴Metofane到棉纸里。抓住小鼠尾巴将小鼠提起几秒然后放进空试管中。小鼠最终将会爬进里面避免被悬空。保持一会直到小鼠失去意识。在之后的操作中，保持小鼠的头在试管中。

如果试管保持封闭，就可以在几次试验中不换Metofane。

注意：此步骤应该在通风良好的地方完成。如果检测到Metofane蒸气，应该观察合适的通风条件。

4b. inhalation chamber的使用。在通风橱中准备chamber，用一块浸泡在Metofane中的棉纸或纱布使之置于格子下的玻璃chamber（不要用塑料的）中，或者其他一种将小鼠密闭其中的东西（Metofane是一种皮肤刺激性物质）。将一只小鼠放入inhalation chamber中并关上盖子。等待1min左右小鼠将会失去意识。将小鼠移至inhalation cone（第4a步）并在下面的步骤中保持小鼠的头在试管中。

5. 对将注射的腿部进行去毛处理。出于快速高效不伤害皮肤的考虑，使用商业化的刮胡刀。选择性的使用锋利的一侧，拉紧后腿向上（与毛生长方向相反）进行去毛处理。如果需要可对失去意识的小鼠使用穿耳枪进行身份确认。
6. 将小鼠放在一张干净的一次性bench paper上，用70%乙醇消毒后腿。
7. 用微量移液枪轻轻地吹散成块细胞上清液。用50μl Hamiliton注射器吸入细胞，按下面的操作避免吸入气泡。

8a. 侧腓肠肌注射。将小鼠侧放并使其头远离自己，用拇指和无名指持小鼠脚，并用食指和中指固定其腿部，标记侧腓肠肌的位置，从鼠腿的膝盖以下至踝关节背侧部。持针以45°角慢慢地刺入皮肤，将针推进在胫骨背部的肌肉中1～2mm深。慢慢地注射5μl至肌肉，几秒钟后慢慢拔出针头。

如果你想在较原始的腿部肌肉达到最大的注射量，总体积50μl，10^5个细胞/μl效果最好。这些细胞悬液可被分为10次，每腿每次注射5μl，尽管悬液可能因为针的原因泄漏一部分。做为选择，50μl悬液可以被分成尽量多的次数注射，每次约1μl。其结果使肌细胞与更多受体纤维组织融和，也许它将花费更多的时间并且引起更多的潜在的肌损伤。

8b. tibialis anterior注射。将鼠背朝下放置，慢慢地将它的腿拉直。标记tibialis ante-

rior 的位置，小腿两块骨中处于内侧且较大的一块，从膝部延伸至踝部。找到膝盖骨，在膝盖向下至踝关节大概 1/3 处注射细胞。

9. 将小鼠放到带有动物用草垫的笼子中，使其恢复知觉（一般在使用 Metofane 2～5min 后）。

备选方案 2　直接肌肉注射质粒 DNA

直接肌肉注射质粒 DNA 的操作步骤与注射肌细胞步骤十分相似。成熟的步骤是将质粒用 PBS 浓缩成 1mg/ml，并以 5～10μl 体积注射。DNA 的纯化步骤是很重要的，如果质粒被有吸附能力的柱状物纯化——如 Qiagen，它必然将去除细菌内毒素（可以引起注射部位发炎）。Qiagen 销售的试剂盒可以在注射前一周用一小块干冰对将要注射部的肌细胞造成损伤，尽管这需要两次重复的切开和缝合。心脏中毒素和 bupivacain 也可在注射前对肌细胞造成损伤。然而，大部分调查人并没有做先期的操作而只是简单地注射 DNA 溶液。短暂地暴露注射过的肌肉于高电压下，可以加快 DNA uptake 效率。

支持方案　用 FACS 分离 *lacZ*-labeled 细胞

FACS 的细节见 Coligan 等（2004）。

材料（标√的条目参见附录 1）

200mmol/L 荧光素钠 di-β-D-galactopyranoside（氟脱氧葡萄糖；100×；分子探针）在 1∶1（*V*/*V*）DMSO/water（－20℃阴暗储存）

细胞储存在：*lacZ* 表达细胞（见基本方案 2）和不表达 *lacZ* 的调控细胞

√FACS 染色缓冲液，室温 37℃

√FACS 阻断缓冲液，冻存

√F-10-或者 F-10/DMEM 初级肌原细胞生长培养基

√胶原包被组织培养皿

桌面离心机（如 IEC HN-SⅡ）

荧光素钠激活的细胞分类机（如 Becton Dickinson FACStar）

注意：对 *lacZ* 表达细胞和不表达 *lacZ* 的调控细胞应平行地进行准备。

1. 融解 1μl 200mmol/L FDG 于 99μl 水中，37℃水浴
2. 取 1×10^4～5×10^6 胰酶消化下的细胞，4℃，350*g* 室温离心，之后用 100μl FACS 染色缓冲液重悬，37℃水浴 10min 后加 100μl 预热的 FDG，37℃孵育 1min。
3. 加 1.8ml 冰冷的 FACS 阻断缓冲液，置冰上。尽快保持细胞冰冷分开。
4. 用荧光活性细胞分选仪检测 forward scatter，碘化丙啶 PI 和荧光素。分离细胞，弃去 PI 阳性（死细胞）细胞和任何荧光阳性水平低于设定好的极限的细胞。如果细胞量不能到达两个可辨别的峰之间，使用对照细胞样本去确定背景荧光水平。
5. 用分选仪沉淀设定好的细胞于一个 F-10-或 F-10/DMEM-based 肌细胞培养基中（通常有 5%～10%的细胞有最高的表达）。加到被沉淀的细胞里的培养基的量依据期望的分选的细胞数；尽量在适度地高密度水平分选这些细胞。
6. 将分选的细胞铺在胶原质包被的皿中并转至培养箱中。

基本方案 4　对小鼠通过 quadricpeps 肌肉的肌肉注射进行 DNA 疫苗管理

材料（标√的条目参见附录 1）

小鼠（通常用 C57BL/6 和 BALB/c 系）
√麻醉剂
√DNA 疫苗溶剂，适当的溶解（≤2mg/ml；图 13.2.1）
70%（V/V）乙醇
0.3ml 和 1ml 吸管
26-G、28-G 和 0.5-in 针头
电子剪切机
棉球或者纱布垫

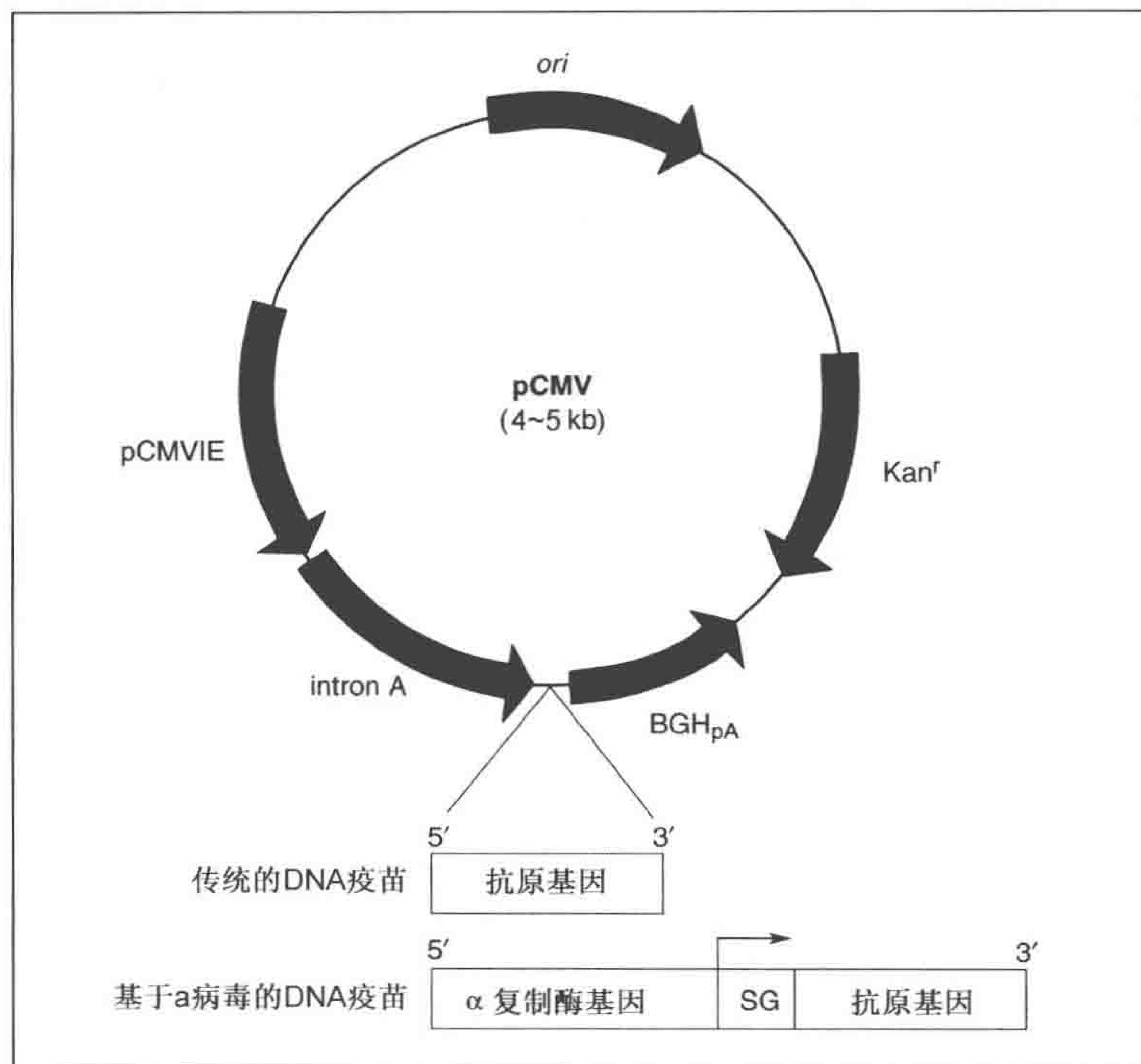


图 13.2.1　一个典型的疫苗载体包含几个重要的元件，有启动子（人细胞巨化病毒主要的临时/早期的启动子或 pCMVIE），转录终止子（来源于胎牛生长激素，BGH_{pA} 的聚乙酰化信号），细菌来源的复制起始子（*ori*），抗体的拮抗基因（Kan^r），在该位置基于 a 病毒的 DNA 疫苗编码的 a 病毒的 RNA 复制子，并带有一个亚基因组（SG）的启动子，启动抗原基因的表达。

1. 通过腹腔注射 0.3ml/18～20g 总体重 麻醉剂麻醉一只小鼠，使用 26G 针头的 1ml 注射器。这将使小鼠麻醉 15～20min。
2. 用 28G 针头的 0.3ml 注射器装入足够的 DNA 疫苗进行免疫（一般 50μl/腿，100μl/鼠）。
3. 将小鼠背朝下头抬高（腾出地方可以抓住它颈部的皮肤），刮去四头肌上的毛。

4. 用一只手抓住它颈部的皮肤使之无法活动，用另一只手抓住脚至踝关节处并使之于膝盖处弯曲，这样易于四头肌的注射。用棉球蘸 70%乙醇湿润四头肌及其周围。如果可能的话，两人操作。
5. 45°，2～3mm 注射四头肌，如果针头触到大腿骨说明扎得过深，慢慢地注射 DNA 疫苗溶液，之后慢慢拔出针头，如果注射正确的话将可以看到或感到肌肉部位的肿大。
6. 在另一个四头肌处重复注射操作。

备选方案 3 对小鼠通过 anterior tibialis 的肌肉注射进行 DNA 疫苗管理

对 anterior tibialis 进行预防接种在基本方案 4 中有演示，除了膝盖到踝关节外侧已经被准备并注射了。在给注射器装液之后（50μl/腿，注射两只腿），针头套有 0.38mm-i. d. 的聚乙烯管所以只有斜面的针被暴露。DNA 溶液以适中的压力稳定注射。由于适当的接种深度被控制确保其可以进入肌肉中心，所以这个方法具有良好的再生能力。

参考文献：Aihara and Miyazaki，1998；Amara *et al*.，2001；Barr and Leiden，1991；Shiver *et al*.，2002；Ulmer *et al*.，1993；Wolff *et al*.，1990

编者：Matthew L. Springer，Thomas A. Rando，and Helen M. Blau(myoblast injection)；Jeffrey Ulmer and Rino Rappuoli (DNA vaccination)

单元 13.3 脑的基因转移：间接体内法和直接体内法

图 13.3.1 中所示的是间接体内转移的概况；图 13.3.2 所示的是直接体内转移的概况。细胞株和原代细胞能够得以利用，而细胞株因在移植后有形成肿瘤的倾向，其应用也就受到一定的限制。

表 13.3.1 植入脑部细胞的基因的表达情况的鉴定

水平	分析	方法
解剖学	移植细胞的存活	亚氨嗪染色
		免疫化学
	移植/宿主细胞相互作用	电子显微镜
	突触后的改变	放射自显影
电生理	移植/宿主细胞相互作用	刺激唤醒活性
	移植/宿主细胞自发行为	体内照相
生物化学	基因产物的表达	微量渗析(分泌的转基因的检测)
		移植的细胞从大脑的离后的生化分析
行为学	整体的/条件的行为	水迷宫
		爪子触
	自发的/无限制的行为	高/活动减退
	药物诱导的行为	不对称旋转

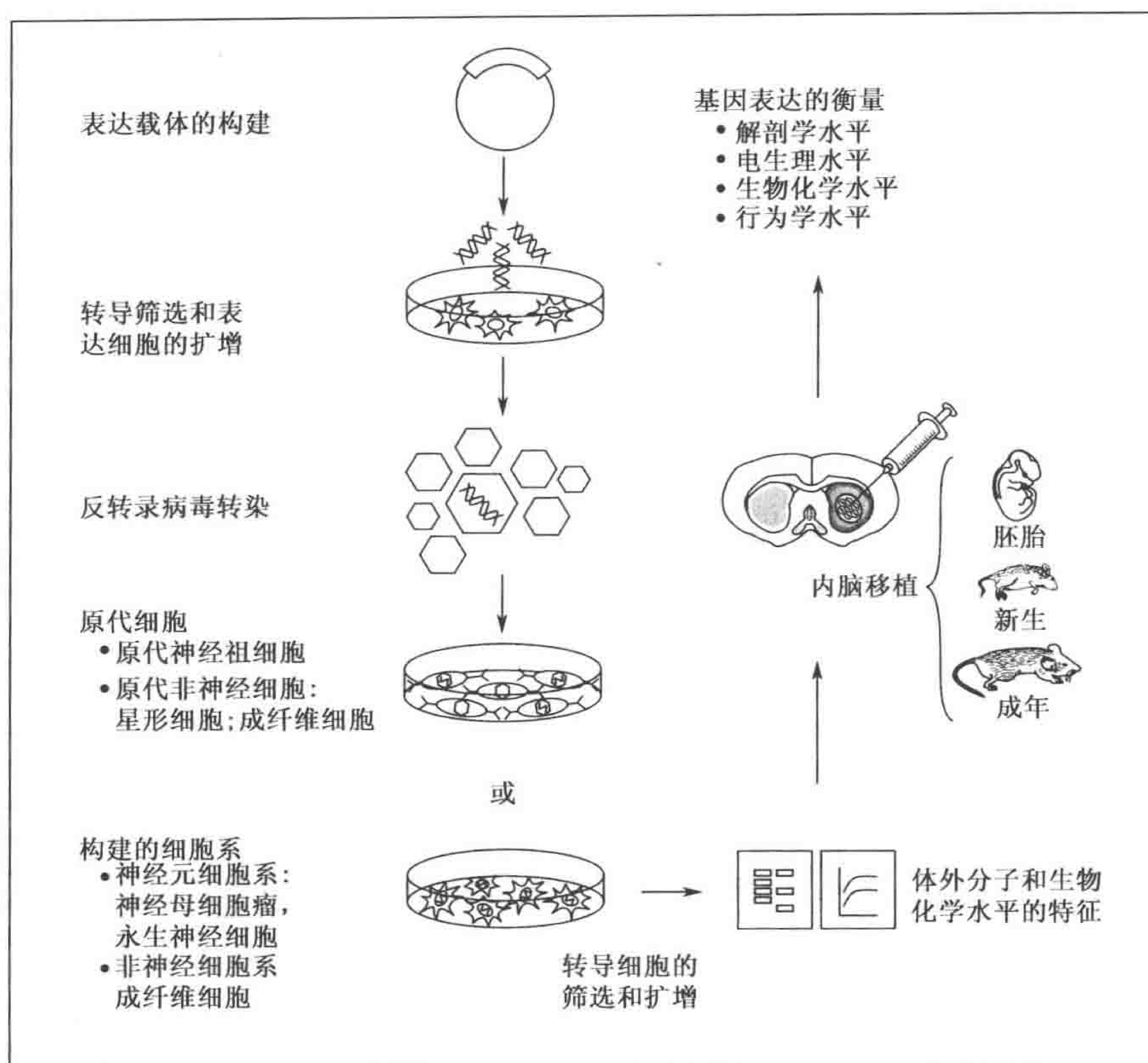


图 13.3.1　间接体内基因转移策略。携带有目的基因的反转录病毒载体构建好以后被转染到包装细胞中。稳定转染的细胞经过筛选和扩增，然后重组的病毒从包装细胞中收集起来以用于感染原代细胞或细胞株。通过筛选后，扩增稳定转染的细胞，并检测转基因的表达，最后移植到动物的胚胎，新生动物或成体动物的脑内。结合表 13.3.1 中所列举的方法可检测外源基因在体内的持续表达情况。

由于不同小鼠系的脑功能区的定位不同，对于一个特定的品系的定位需要用操纵实验来确定：在小鼠脑部的特定位置注射小剂量的燃料，处死动物，然后决定注射位点。

持续的转基因动物的生产与他们在改善动物模型功能性缺陷中功效的相关性需要通过行为测试，对转基因产物的生物化学分析、免疫组化、原位杂交或者电镜技术等在手术后恰当的时间点来确定。

注意： 所有与活体动物相关的步骤必须符合 NIH 以及研究机构或者大学的指引，还需要被动物保护与使用委员会（IUCAC）许可。

注意： 注射细胞时，注射针头的延长使用将更可能导致针头堵塞。按照规定，用盐溶液冲洗针头后再用乙醇冲洗，检查细胞悬液是否能自由地从针头中注射出来。

注意： 所有将要与细胞接触的溶液和设备都必须是无菌的，相应的无菌技术需要被恰当的使用（附录 3I)。所有的培养过程都在 37℃，5% CO_2 的湿润的培养箱（使用预热的培养基）中进行，除非有别的特需要求。

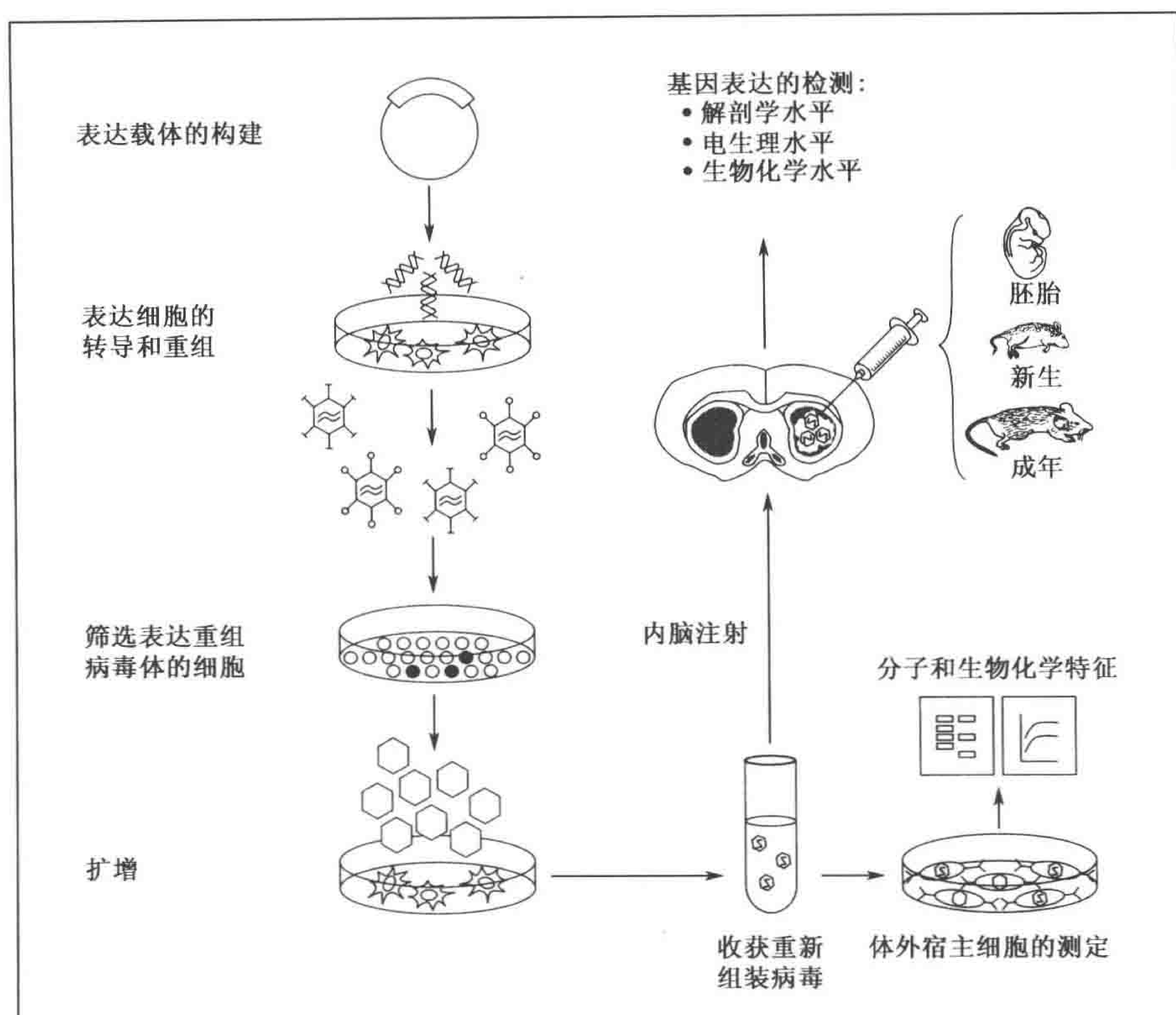


图 13.3.2　活体内基因转移策略。将需要的基因构建入载体，用来导入生成细胞。通过筛选和扩增获得稳定转染的细胞。重组病毒从生成细胞中收集，直接注射到特定的大脑区域内。有许多种病毒载体可以应于这一目的。活体内外源基因的持续表达可以通过表 13.3.1 所列方法的组合使用来检测。

基本方案 1　在成年小鼠脑内植入遗传修饰过的细胞

材料（标√的条目参见附录 1）

遗传修饰细胞的培养（见支持方案）

成年宿主小鼠

√麻醉剂

betadine 聚烯吡酮磺溶液（10% povidone iodine；J. A. Webster）

opthalmic ointment（Mycitracin；Upjohn）

Antibiotic powder（Neo-Predef；Upjohn）

小鼠大脑图片集（Paxinos and Watson，1986）

耳打孔器（Fisher）或者耳标（Harvard Bioscience）

带有电极操作的脑定位支架以及汉密尔顿注射夹（小动物脑定位，模型 no. 900，45°tip ear bars，模型 no. 955；David Kopf instruments）

外科用具：

10 号解剖刀

bulldog 磁夹
海绵
中号镊子
7mm 伤口夹和伤口夹操作器
牙科 2 号钻孔器
26G 针
5μl 汉密尔顿注射器

1. 为移植开始培养基因修正的细胞，收获 80%～90%的汇合度的细胞。手术时，当麻醉和准备动物的时候准备好悬浮细胞（支持方案）。手术期间，每 30～60min 重悬细胞。
2. 参考鼠脑图像决定注射位置，通过 anterior-posterior 和 medial-lateral 坐标假定脑功能区定位支架的前囟点，通过垂直坐标假定硬脑脊膜。
3. 麻醉一个成年的宿主，注射 0.25ml 麻醉液，每 160g 体重和标记动物加 1 个耳打孔器或耳标。
4. 放置好一个麻醉小鼠在一个脑功能区定位区域。以维持啮鼠动物脑在正确的位置，插入耳棒，小心在计算好的刻度上系紧。准确放置口棒。
5. 在皮肤上开个小口，位于眼耳中线。用 10 号解剖刀分开皮肤并清洁皮肤，去除血和粘连组织。
6. 确定前囟点，确定坐标，在头盖骨上开一个 1mm 直径的孔，用 26G 针切除硬脑脊膜。
7. 用吸管轻轻吹打以重新分开细胞悬液。吸 1～3μl 75 000～300 000 个细胞每注射点。在脑功能区定位支架上装好带有 5μl 汉密尔顿注射器的电操纵器，并避免气泡。
8. 轻轻注射溶液，并使注射速度低于 1μl/min。当注射完毕时，抬起针头 1mm，静置 2min，收针。
9. 如果多于两个注射点，在新坐标上再打一个 1mm 直径的孔，重复注射操作。避免每只小鼠注射量大于 10μl。
10. 拿开小鼠，清洁头盖骨，用抗菌素消毒。用伤口架子夹紧皮肤，把动物转移至恢复笼子。

基本方案 2　植入基因修正的细胞到新生的小鼠脑内

按照下面步骤操作可以降低术后的母体忽视和自相残杀，使怀孕小鼠适应后来工作的新环境。不要用极度活跃的鼠妈。戴手套操作。放纸巾在笼内，之后一次移开几只幼鼠。术后尽量快地放回幼鼠。切记要擦干净表面的血液。术后一周内使笼子远离噪声。

材料

基因修正的细胞
新生小鼠（P0-P2）
100%乙醇
抗菌素

外科胶水
脑功能区定位支架上装好带有 5μl 汉密尔顿注射器的电操纵器
显微操作仪
手术用具：
培养基和平端的钳状骨针
7mm 伤口夹和伤口夹操作器
幼鼠脑图谱
5μl 汉密尔顿注射器和 26G 针
37℃加热板

1. 为移植开始培养基因修正的细胞，收获 80%～90%的汇合度的细胞。手术时，当麻醉和准备动物的时候准备好悬浮细胞（支持方案）。手术期间，每 30～60min 重悬细胞。
2. 将新生幼鼠置于湿冰 5min 以麻醉。之后用 100%乙醇灭菌头部。将麻醉的幼鼠放于脑功能区定位支架在显微操作仪下。
3. 麻醉一个成年的宿主，注射 0.25ml 麻醉液，每 160g 体重和标记动物加 1 个耳打孔器或耳标。用显微解剖镊子拉紧之后清洁并干燥头盖骨表面以去除血液和粘连组织。
4. 确定前囟点，通过新生鼠脑图谱确定坐标，确定头盖骨上的注射位置并用 11 号手术刀在软骨的头盖骨上开一个 1mm 直径的孔。
5. 用吸管轻轻吹打以重新分开细胞悬液。吸 1～2μl。在脑功能区定位支架上装好带有 5μl 汉密尔顿注射器的电操纵器，并避免气泡。
6. 轻轻注射溶液，并使注射速度低于 1μl/min。当注射完毕时，抬起针头 1mm，静置 2min，收针。
7. 如果多于两个注射点，重复第 4～6 步。
8. 拿开幼鼠，清洁头盖骨，用抗菌素消毒。用伤口架子夹紧皮肤，用 37℃的热板复苏幼鼠当其恢复活动能力时把动物转移至母鼠身边。

基本方案 3　植入基因修正的细胞到胎鼠脑内

材料（标√的条目参见附录 1）

基因修正的细胞
计时的怀孕鼠
√麻醉液
75%乙醇
眼油膏
抗菌素
37℃加热板
消毒纸巾
手术用具：
培养基和平端的钳状骨针

7mm 伤口夹和伤口夹操作器

眼构造

产前的鼠脑图谱

5μl 汉密尔顿注射器和 30G 针

术后恢复笼

1. 为移植开始培养基因修正的细胞，收获 80%～90%的汇合度的细胞。手术时，当麻醉和准备动物的时候准备好悬浮细胞（支持方案）。手术期间，每 30～60min 重悬细胞。
2. 每 160g 体重用肌肉注射 0.25ml 的麻醉液麻醉计时的怀孕鼠。刮腹部并用 75%的乙醇消毒。用眼膏使小鼠眼睛保持湿润。放置麻醉鼠在 37℃加热板，上面盖消毒纸巾。
3. 做剖腹产，移除子宫的角质。透照以确定胚胎解剖学结构并确定端脑的小囊泡和颅盖的缝。参考产前的鼠脑图谱。
4. 用吸管轻轻吹打以重新分开细胞悬液。吸 1～3μl 至 5μl 汉密尔顿注射器，并避免气泡。
5. 需要慢速注射入脑的薄壁组织或胚胎脑室内。当注射完毕时，抬起针头 1mm，静置 2min，收针。
6. 如果多于两个注射点，重复第 4～5 步。之后重复注射步骤于每个胚胎。
7. 把子宫角质重新放回腹部内。缝合并消毒。转移妈妈至恢复笼，允许它恢复并生产。

基本方案 4　植入胶原的基因修正的成纤维细胞入成年鼠脑的腔内

collagen plugs 被用作专门需要 aspirative 损害实验的胶原填料。这个损害腔扰乱了在脑区域和胶原填料包括细胞的通路。这些细胞表达了转基因特点被移入了腔中并在两个区域间创造了一个物理的桥梁。

材料（标√的条目参见附录 1）

基因修正的成纤维细胞

√PBS

√DMEM/10%FBS 培养基，37℃

0.1mol/L NaOH

√0.3%胶原酶

成年宿主鼠

抗菌素

1.5ml 圆锥管

37℃，10% CO_2 孵育箱

带有 2 型的钻孔器的牙科钻头

27G 针

有真空装置的修改的巴斯德管

手术用具：

培养基和平端的钳状骨针

7mm 伤口夹和伤口夹操作器

水凝胶泡沫

术后恢复笼

1. 用 PBS 和胰酶清洗基因修正的成纤维细胞。用 37℃ DMEM/10%FBS 培养基重悬细胞。细胞计数并调整细胞浓度约为 162μl 含 1.2×10^5 细胞。平分 162μl 至 1.5ml 的圆锥管中。
2. 每个等分量，加 6.9μl 的 0.1mol/L NaOH 并温和吹打混合细胞。如果颜色没有变成粉色，则加更多的 0.1mol/L NaOH。
3. 立刻加 81μl 的 0.3%的胶原酶并吹打混匀。拧紧管子上下颠倒使胶原酶混匀。拧松管子并放于 37℃，10% CO_2 孵育箱过夜。如果转基因产物从细胞中分泌出来，用上层清液定量数量。
4. 麻醉并准备手术用的成年宿主鼠（基本方案 1，第 2～5 步）。
5. 确定前囟点。从鼠脑图谱中确定坐标，用牙科钻头从要求的点到头盖骨上开一个 1.5mm 宽的洞。用 27G 针切开硬脑脊膜。
6. 用有真空装置的修改的巴斯德管通过温和地吸出组织在要求的脑部区域上制造一个 aspirative 损害腔。

   这个管子是通过弯曲管头修改的并且在管子的顶部有洞。当它与真空装置相连时，液体可以通过用手指打开或按住小洞来控制流量。这样的设计可以更好地控制组织的损害。
7. 用平端的钳状骨针，移开 2～3mm³ 的含有成纤维细胞胶原填料。将其移入伤口内，并且用水凝胶泡沫推下填料。填料应该填满腔。如果需要，填料可以被修剪成腔的大小，但是细胞移植的数量是不知道的。
8. 将小鼠从脑功能区定位支架下移开，清洗头盖骨，在伤口上面盖灭菌纸巾。将皮肤盖拢，用伤口夹夹好皮肤切口，将小鼠转移至恢复笼。

基本方案 5　直接注射重组体病毒载体至小鼠脑内

材料（标√的条目参见附录 1）

成年鼠

重组体病毒悬液

消毒纸巾

小鼠脑图谱

手术用具：

培养基和平端的钳状骨针

7mm 伤口夹和伤口夹操作器

5μl 汉密尔顿注射器和 26G 针

术后恢复笼

1. 麻醉成年鼠，准备手术。在头盖骨上钻洞。注射的病毒可以在脑中扩散 3～4mm。

2. 4min 后用 5μl 汉密尔顿注射器缓慢注射 2～4μl 重组体病毒悬液至目标区域。当注射完成后，将针头抬起 1mm，静置 2min，1min 内收针。

   在作者的实验室，腺病毒的滴定量是 10^9 到 10^{11} 病毒颗粒/ml，腺相关病毒为 10^{11} 病毒颗粒/ml，HIV 或 MoMuLV 是 10^9 病毒颗粒/ml。

3. 如果多于两个注射点，重复第 5～6 步。每个鼠注射量不要大于 10μl。
4. 将小鼠从脑功能区定位支架下移开，清洗头盖骨，在伤口上面盖灭菌纸巾。将皮肤盖拢，用伤口夹夹好皮肤切口，将小鼠转移至恢复笼。

支持方案　基因修正细胞的准备

材料（标√的条目参见附录 1）

病毒载体转染重组体成纤维细胞或者神经祖细胞（单元 12.4）
√DMEM/10%FBS（成纤维细胞）或者 DMEM/F12/FGF（神经祖细胞）
√PBS
ATV 胰酶
√D-PBS
FGF-2，神经祖细胞只用 $75cm^2$ 的培养瓶或者 10cm 的培养皿
IEC 临床离心机或者同等物
计数器，成纤维专用

成纤维细胞

1a. 在 $75cm^2$ 的培养瓶或者 10cm 的培养皿用 DMEM/10%FBS 培养成纤维细胞直至细胞生长至 80%～90% 汇合度。不要用静止期的细胞因为这些细胞移入脑后很难成活。

2a. 洗细胞两遍，每次用 10ml 的 PBS。加入 1～2ml 的 ATV 胰酶到培养瓶中并在室温孵育 2～3min。拍打瓶子使细胞消化下来。

3a. 用 8～9ml 的 DMEM/10%FBS 重悬细胞，将其移入 15ml 离心管中，1000*g* 室温离心 3min。倒掉上清。用 1ml 的 D-PBS 重选细胞，用 1ml 的习惯吹打混匀。加 4ml 的 D-PBS 并洗细胞 2 次，1000*g* 离心 3min。在最后一次离心之前，计数细胞。0.4ml D-PBS 重悬细胞，转移至 0.5ml 的离心管中，2000*g* 离心 1min。

4a. 倒掉上清并用 D-PBS 重悬成纤维细胞，制成 50 000～100 000 个细胞/μl的细胞悬液。置于室温或者冰上。3h 内移植细胞。

神经祖细胞

1b. 在 $75cm^2$ 的培养瓶或者 10cm 的培养皿用 DMEM/F12/FGF 培养神经祖细胞直至细胞生长至 80%～90%汇合度。

2b. 去除培养基，加入 1～2ml 的 ATV 胰酶到培养瓶中并拍打瓶子使细胞消化下来。

3b. 用 8～9ml 的 DMEM/F12/FGF 重悬细胞，将其移入 15ml 离心管中，1000*g* 室温离心 3min。倒掉上清。用 1ml 的 D-PBS 重选细胞，用 1ml 的习惯吹打混匀。加 4ml 的 D-PBS 并洗细胞两次，1000*g* 离心 3min。在最后一次离心之前，血细胞计数器计数细胞。0.4ml D-PBS 重悬细胞，转移至 0.5ml 的离心管中，2000*g* 离心 1min。

4b. 倒掉上清并用含有 20ng/ml FGF-2 的 D-PBS 重悬神经祖细胞，制成 50 000 个细胞/μl 的细胞悬液。置于室温或者冰上。3h 内移植细胞。

参考文献：Akli *et al.*，1993；Fisher *et al.*，1991；Kawaja *et al.*，1992

编者：Jaana Suhonen，Jasodhara Ray，Ulrike Blömer，and Fred H. Gaga

单元 13.4 人造血干细胞的培养、转导和分析

注意：所有的与活细胞接触的溶液和设备必须是无菌的，操作也必须是无菌操作。除非特殊要求，所有的培养箱也都应该是 37℃，5% CO_2。

注意：骨髓细胞对极小的污染物都反应敏感，所以所有的试剂应该经过毒性检验。培养基和细胞培养成分从 Stem Cell Technologies 购买。

基本方案 反转录病毒介导的基质细胞支持 $CD34^+$ 细胞转导

反转录病毒介导的转导在图 13.4.1 中已经提过。转导的基质细胞层可以来源于相同宿主或者不同宿主。当转导的细胞来源于一个有基因病的患者体内时，必须使用相同来源的基质细胞以避免正常基因复制引起的污染。

材料（标√的条目参见附录 1）

人骨髓、脐带血或用抗凝血剂处理的外周血
√HBSS
√PBS（4℃，37℃）和 10×PBS
Ficoll-hypaque
√BBMM
75cm² 培养瓶带有 0.2μm 过滤器的盖子，CD34 抗体骨髓专用，灭菌的过滤器
√5%（*V/V*）FBS/PBS，4℃
包被磁珠的鼠抗 IgG
√转导培养基，室温至 37℃
反转录病毒载体上清液
1mg/ml 鱼精蛋白硫酸盐
√LBMM
√甲基纤维素培养基
√50mg/ml 的 G418
100mmol/L HEPES 溶液
铯辐射源
15ml 和 50ml 离心管
Beckman 的 GS-6R 离心仪和 GH3.7 转子可以用 15ml 和 50ml 离心管，室温和 4℃
旋转平台
25cm² 和 75cm² 培养瓶带有 0.2μm 的过滤器盖子

免疫磁性选择装置

1ml 注射器

35mm×10mm 培养皿

35mm 和 10cm 培养皿

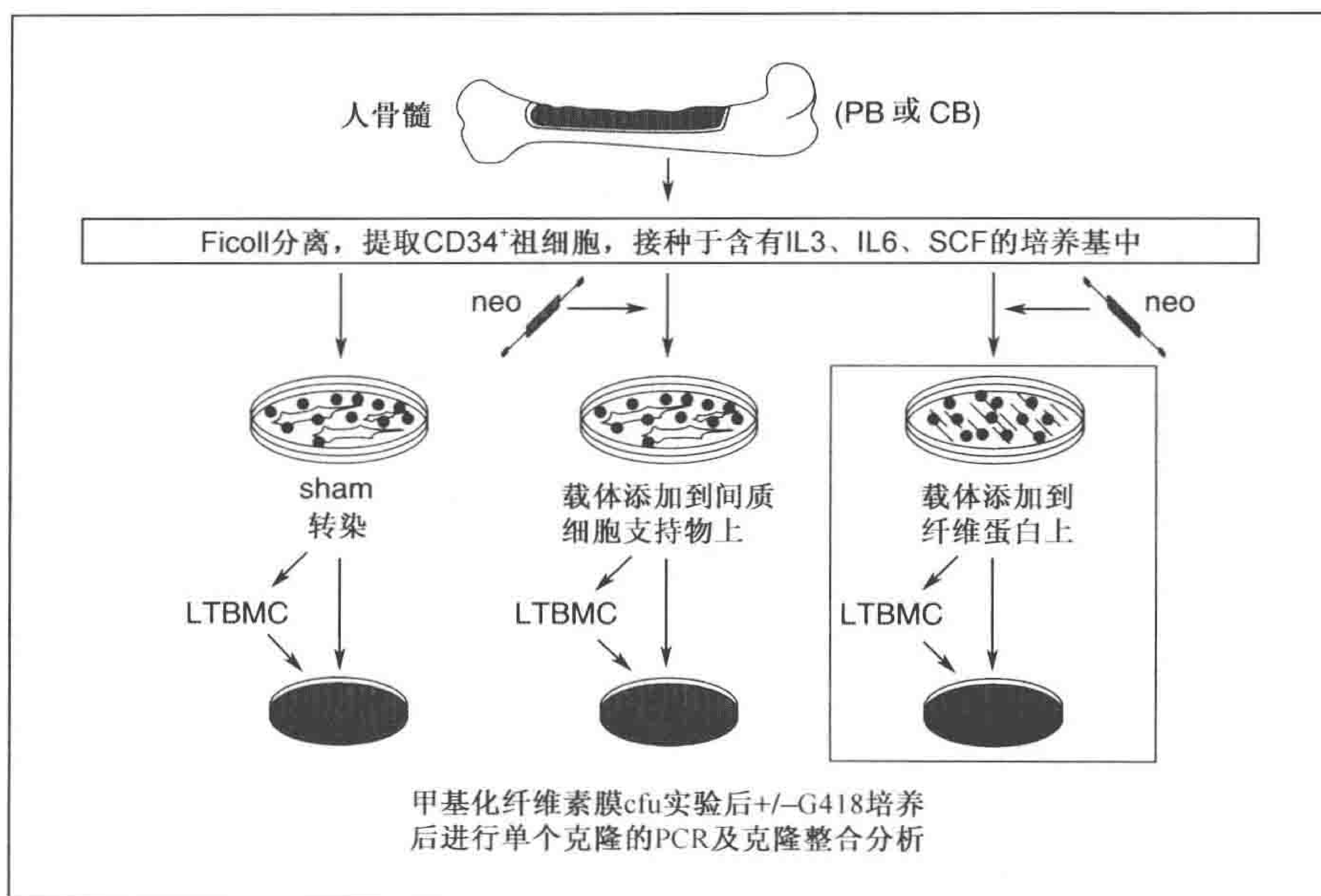


图 13.4.1　造血干细胞的转染。造血干细胞样本来源于骨髓、脐带血（CB）、外周血（PB）。Ficoll 或者 Ficoll/Percoll 密度梯度离心出去血红细胞。$CD34^+$ 祖细胞通过免疫磁珠富集，并且接种于含有细胞因子白介素 3（IL3）、白介素 6（IL6）、干细胞因子（SCF）。辐照的人异体间质细胞支持层在转染时被用来共定位逆转录病毒颗粒和靶细胞。图示中另外的替代方法包括血浆纤维蛋白羧基端的包被。用来生产逆转录病毒的成纤维细胞上清经过滤除菌后加入孵育 24h，持续 3d。图示中用到的是 LN 反转录病毒（图 12.4.2），该病毒带有抗 G418 的 neo 基因。转染后细胞分别接种在含有 G418 和不含 G418 的基于甲基纤维素膜克隆形成实验（cfu）。剩余细胞在长时骨髓培养中维持（LTBMC）。转染后的细胞样本在经过几周的培养后，移去 LTBMC，即可以进行 PCR 或者 Southern、Northern、Western blot 的检测。Cfu 可以从 LTBMC 中移出培养 5 周。克隆经过 14d 生长后可以从甲基化纤维素膜上调取出来，然后对 neo 基因进行 PCR 检测和反向 PCR 分析克隆整合。

1. 0 天：准备初期的人间质细胞，铯辐射源照射它们。需要一个非转导用培养瓶，用于接收培养基。
2. 1 天：收获骨髓，脐血和外周血细胞样本。分别用 HBSS 和 PBS 调节骨髓和血样本体积相同。
3. 在 10ml 10×PBS 中加入 90ml Percoll，配成“100%Percoll”。将 100ml 100%Percoll 加入到 39ml HBSS 中配成 72% Percoll（可以根据需要调高或调低用量）。
4. 小心地将 15ml 72% Percoll 加入到 50ml 聚丙烯离心管中，再加入 5ml Ficoll-Hypaque 和 30ml 稀释的细胞悬液。不要混合液体层。

5. 室温下 730g 离心 15min。从顶部吸去 2/3 的黄色血清层。再吸出血沉棕黄层（不透明的单核细胞裂解物），少于 10ml，移入到一个新的 50ml 管中。
6. 将 40ml HBSS 或 PBS 加入到单核细胞中，混合。室温下 400g 离心 5min，弃去上清，轻弹管底，使细胞能够脱离紧密的细胞沉淀。如果细胞是来源于骨髓，继续第 7 步；如果细胞来源于脐带血或活动的周边血样，继续第 9 步。
7. 在 1ml BBMM 中重悬骨髓细胞沉淀。细胞计数并用台盼蓝测定细胞活度（附录 31）。用 BBMM 稀释到 1×10^6 个细胞/ml。移去任何存在的细胞团块。
8. 将 15ml 细胞悬液加入到胶原酶处理过的 75cm^2 的带有 0.2μm 过滤透气瓶盖的组织培养瓶中。将培养瓶放入培养箱中，让间质细胞贴壁 2h。移去非贴壁的造血细胞，加入到 50ml 离心管中。用 PBS 洗几次培养瓶，并加入到 50ml 管中。

   间质细胞由于是 CD34$^+$ 并使得转导结果无效，所以要移去。培养瓶中的贴壁细胞可以培养成间质单细胞层（支持方案 4，第 3 步）。

9. 把间质细胞分离的单核细胞在 4℃下，400g 离心 5min。移去上清，立即轻弹管底使细胞沉淀重悬，避免团块的形成。
10. 用 25ml 的预冷的 PBS 洗一次细胞，4℃下，400g 离心 5min。弃去上清。用 1ml 预冷的 PBS 重悬细胞沉淀。将分装的一管细胞计数，并测定细胞活度。去除任何存在的细胞团块。将细胞保持在 4℃直到分选完成。
11. 每 1×10^7 个细胞中加入 1ml 预冷的 PBS，移入到一个 15ml 的离心管中。在5μg/ml 的细胞悬液中加入无菌的抗 CD34 的抗体（或由初始的滴定实验决定）。4℃在滚动的平台上孵育 30min。

    如果使用的细胞数量很少（$<1\times10^7$ 个细胞），在冷房内的竖直放置的盛有 0.5ml PBS 的 15ml 管中进行抗体结合和 Dynabead 结合的测定。在结合的 10min 的间期轻弹管底使其轻轻混匀。洗抗体的步骤和浓度保持相同。

12. 4℃下，400g 离心 5min，移去上清。用 12ml 预冷的 5%FBS/PBS 重悬洗两次，离心，移去上清。
13. 用预冷的 PBS 重悬细胞沉淀。加入 20μl 山羊抗鼠 IgG 磁珠/ml 细胞悬液。4℃下在缓慢滚动的平台上孵育 30～60min。
14. 加入预冷的 PBS 调整到最终体积为 7ml。将试管置于磁力器上，进行免疫沉淀。2min 后，小心地移除 PBS，转入到标记了 CD34$^-$ 细胞的试管中。将试管从磁力器上移去，用 7ml 预冷的 PBS 洗 CD34$^+$ 细胞和磁珠。将试管放回磁力器上，在孵育 2min，弃去 PBS 部分。

    磁性小珠可以用木瓜凝乳蛋白酶去除（支持方案 3）。然而如果可能，将它们留在细胞上。他们会在培养 1～2d 后脱落，不会妨碍转导、集落生成单位的形成或移植物移入。木瓜凝乳蛋白酶处理会降低转导能力并去除一些细胞表面决定子。

15. 立即在 2ml 转导介质中重悬 CD34$^+$细胞（通常为 1%骨髓）和小珠并计数细胞。每个 25cm^2 培养瓶中的受辐照的人骨髓基质细胞（第 1 步），稀释 1×10^4～1×10^7 CD34$^+$ 细胞至 5ml 转导介质（最大 1×10^6 个细胞/ml）。
16. 从受辐照基质细胞中去除介质，立即加入 5ml CD34$^+$细胞重悬物。不要让基质层干透。至培养箱培养。确保介质温暖，pH 中性，培养箱中 CO_2 浓度为 4.5%～5.0%

(不要过高)。

17. 以最快速度溶解反转录病毒载体上清。从培养箱中取出培养瓶，加入 5ml 反转录病毒载体上清和 40μl 的 1mg/ml 硫酸鱼精蛋白（终浓度 40μg/ml)。以最快速度将培养瓶放回培养箱中，继续培养 24h。
18. 从转导瓶中小心收集上清，加入 5ml 室温（最低）或 37℃（最高）预热的转导介质，放回培养箱中继续培养。
19. 400g，4℃离心收集上清中的非黏附性细胞 5min。去上清，用手指轻弹重悬细胞团，使细胞和小珠不会凝成块。
20. 加入 5ml 溶解并 37℃预热的反转录病毒载体上清至细胞中。重悬上清液中的细胞并放回至培养瓶。加入 40μl 硫酸鱼精蛋白，立即将培养瓶放回培养箱中，继续培养 24h。
21. 重复第 18～20 步一次。
22. 再培养 24h，直至准备从转导瓶中收获细胞用于集落生成单位平皿培养法测定决定转导效率。

    用 G418 或其他选择剂（如红杉醇、秋水仙素或多药耐药基因）筛选进行集落生成单位分析方法如下所述。对于没有选择标记的载体，可以用单克隆 PCR 进行分析（支持方案 7 和 8)。

23. 用 10ml 移液管吸取瓶中培养基然后让培养基在贴壁细胞上漫过以从基质层中冲洗出转导细胞。不要将培养基直接喷到基质上，否则它会成块掉下。转移非黏附性细胞（和培养基一起）至一新瓶子。用 LBMM 重新营养原贴壁层。

    贴壁层会在下一个星期的过程中成为一个生长旺盛的长期骨髓培养（LTB-MC)。如有必要，可从贴壁层中接种集落生成单位，支持方案 6。

24. 培养非黏附性细胞 2h 以上让基质细胞贴壁以减少分离的基质细胞。如果在瓶底有很多大的基质细胞，将非黏附性细胞转移至一个新瓶子，如此重复，如果只有少数贴壁基质细胞，继续下一个步骤。
25. 收集非黏附性细胞。室温下 400g 离心 5min。去上清，1ml BBMM 重悬细胞团。用台盼蓝处理计数细胞并分析细胞活力。细胞计数对平皿培养法的结果至关重要，所以应对其进行四重计数。计算铺皿的细胞容量：（每个皿所需细胞/细胞数每毫升）×1000＝ 加入至每个皿的细胞重悬物的微升量。如有必要，可对其浓缩或稀释以使体积介于 10～80μl 之间（关键性的)。

    对于从成人骨髓或外周血取得的 $CD34^+$ 细胞，体外转导 72h 后以每皿 500 个和 1000 个细胞数接种。对于脐带血原带细胞、新生儿骨髓细胞或其他途径获得的新分离的人 $CD34^+$ 细胞（用于屏蔽或集落生成单位水平基线)，每皿 250 个和 500 个细胞数接种。

    测定非分裂单核细胞制品含量时，每皿用 5×10^4 个细胞，分析 $CD34^+$ 细胞时每皿用 500 和 1000 个细胞以使每皿产生 50～100 个克隆。

26. 应用无菌技术，准确吸取 1ml 甲基纤维素至一 1ml 注射器。调剂至一个 35mm×10mm 方格网组织培养皿。每瓶（转导和未转导的）准备 8 个该种瓶子（每个浓度各 4 个)。

27. 4个皿加入 50mg/ml G418 18μl，另外 4 个瓶子加入 100mmol/L HEPES 缓冲液 18μl。
28. 在适当的皿中加入经过计算的体积的造血细胞悬液。将培养基池置于板的一边，轻轻振颤，在周围滚动以充分混合。
29. 将每对皿置于一个带有一个含 2ml 灭菌水的 35mm 皿的 10cm 组织培养皿中。在充分增湿的 37℃，含 4.5%～5% CO_2 的培养箱中培养 14～21d。
30. 每个样本中残余部分的细胞接种至 10ml LBMM 中一个双层的受辐照红细胞基质上。

    集落生成单位接种后剩余的细胞可以保存在 LTBMC 中（从第 23 步加入皿中），用于后续的载体表达测试。
31. 去除游离至培养基的成熟细胞、重新营养贴壁的细胞层（含有最初的原始造血细胞）以维持 LTBMC。最初培养的两星期里，每 5 天去除 75%的原有培养基及里面的悬浮细胞，加入同等体积的新鲜 LBMM 营养细胞。

    多能祖细胞附着于间质层或在其下面。在最大膨胀期间（培养后 2～4 周），可以考虑去除 100%的培养基，轻轻冲洗附着的细胞层，以去除松散贴壁细胞，然后加入培养基恢复培养。通过快速补充非黏附的子代细胞可以最大程度收获成熟细胞却不会减少最原始贴壁细胞。

    两周内可以收获非黏附细胞用于 DNA、RNA、蛋白质、免疫组织化学分析（支持方案 9）。
32. 培养末期，用下列标准计数并分类第 29 步中所接种的皿的集落生成单位：

    红系暴发集落形成单位（BFU-E）：至少 3 个大的微红色的红细胞系统的细胞群，其中有些呈红色；群中细胞是不完全圆的，细胞之间看起来在相互挤压；在群之间的克隆中可能有一些白色的圆形细胞，是红细胞系统的细胞群的祖先细胞。

    粒细胞/巨噬细胞集落形成单位（CFU-GM）：大约含有 50 个细胞的克隆；所有细胞都是白色，没有红细胞系统细胞发育；有些细胞可能比其中一些大 3 倍以上，并有一个明显的环圈在里面，这是成熟的含有溶酶体的巨噬细胞。

    粒细胞/红细胞/巨噬细胞集落形成单位（CFU-GEM）：具有上述各种细胞；可能还含有巨核细胞（CFU-GEMM），他们是一些极大的具有多叶片细胞核的细胞。
33. 如果 G418 用于确定 *neo* 的转染程度，从相同细胞浓度细胞板中计算一系列细胞板的抗性克隆数，即通过比较含有 G418 和不含 G418 的细胞板的克隆数：（含有 G418 细胞板的克隆数/不含 G418 的细胞板的克隆数）×100 ＝ % $G418^r$cfu。

备选方案　在纤维连接蛋白涂铺的盘子上进行反转录病毒介导的转导

附加材料（基本方案；标√的条目参见附录 1）

重组纤维连接蛋白 C 端片段（retronectin；Bio-Whittaker）或低压冻干的血浆纤维含有 CS-1，RGD，和肝磷脂结合结构域的 C 端片段

√2%（*m/V*）BSA：去离子的 10% BSA 用 PBS 按 1∶5 稀释（见 个别处方）

细胞解离液（Life Technologies）

6 孔组织培养板或 35mm 组织培养皿

1. 准备用于转导的 $CD34^+$ 细胞（基本方案，第 2～15 步），除将细胞密度调整至 1.5×10^5 个细胞/ml 外。
2. 以 50μg/ml 用 PBS 重悬低压冻干的重组纤维连接蛋白 C 端片段，冰冻并保存在 −20℃（避免反复冻融），或保存在 4℃，一个月内活性不会明显降低。
3. 加 2ml 纤维连接蛋白重悬物至 6 孔组织培养板的孔或 35mm 组织培养皿，室温下培养 1h，去除纤维连接蛋白重悬物，加 2ml 2%BSA 封闭之，室温下培养 30min。为方便，纤维连接蛋白重悬物可保持至 12h 或 2%BSA 培养 4h。
4. 去除 BSA，用 PBS 从边沿小心的清洗细胞板。立即加入细胞和反转录病毒上清液用于转染。不要让孔干透。每个用于转导的样本，6 孔板中每孔加 2ml 含 $CD34^+$ 原始细胞转导培养基和 2ml 反转录病毒载体上清，培养 24h。
5. 小心去除培养基，室温下 400*g* 离心 5min。去除上清液，轻敲管子保持细胞分散。将细胞重新接种至孔中，每孔加入新鲜的 37℃ 预热的转导培养基和 2ml 反转录病毒载体上清液，培养 24h。
6. 按照生产商说明书用细胞解离液处理去除纤维连接蛋白层中原始细胞。清洗、计数并接种细胞至甲基纤维素培养基，屏蔽菌落形成单位（基本方案，第 25～33 步）。

支持方案 1　维持生产载体的成纤维细胞

在含有 15ml D10HG（附录 1）的 $75cm^2$ 培养瓶中生长生产载体的成纤维细胞（VPF）。当细胞密度达到 80%时用胰蛋白酶处理传代以保持细胞不要过满。冻存早期传代细胞作为原种。如果 VPF 在体外培养达到几个星期，对其进行重新选择以确定其含有载体和包装质粒。ATCC 中有适合各种细胞系选择的信息。

从 VPF 中收集的上清的滴度在 3T3 细胞的测量时必须大于 5×10^6 感染性单位/ml。如果滴度过低，应该从包装细胞的原始细胞池重新获取新的高滴度的克隆（单元 12.4）。

支持方案 2　收集用于转导的无细胞上清

材料（标√的条目参见附录 1）

培养生产载体的成纤维细胞（VPF，支持方案 1）

√D10HG 培养基，32℃

胰蛋白酶/乙二胺四乙酸溶液（Bio-Whittaker）

$75cm^2$ 组织培养瓶，具有 0.2μm 过滤通气孔道（Costar）

32℃ 增湿，4.5%～5.0% CO_2 培养箱

有乙酸钙薄膜的 0.45μm Uniflo-25 注射器式滤器（Schleicher & Schuell）

10ml 聚丙烯管

1. 胰蛋白酶消化培养的 VPF（附录 31），在有 10ml 预温的 D10HG 培养基的 $75cm^2$ 组织培养瓶中以 10^6 个细胞的浓度重新接种培养细胞。侧放培养瓶，37℃ 培养箱培养

1～2d，直至细胞几乎长满。

2. 用预热的 D10HG 培养基换液。转移培养瓶至 32℃培养箱以产生上清液，培养 48h。
3. 收集上清液，清除长满的单层 VPF 细胞。用有乙酸钙薄膜的 0.45μm Uniflo-25 注射器式滤器过滤上清液，用 10ml 聚丙烯管每管 5ml 储存上清液于－70℃直至用于转导。

支持方案 3　从免疫磁测定选择的细胞中用酶去除磁性小珠

CD33 和 CD14 抗原决定簇用木瓜凝乳蛋白酶分开，所以下续的基于这些抗原决定簇的荧光激活细胞分类术（FACS）分析已经不可用。然而，CD2、CD3、CD34（HPCA-2 和 8G12）、CD45 抗原决定簇还在。

从分离的 CD34 获得的纯度百分比可以这技术利用一小部分储存的细胞获得，然后用 HPCA-2 抗体标记（Becton Dickinson Immunocytometry），进一步 FACS 分析。

注意：用于转导的细胞不应该用木瓜凝乳蛋白酶处理去磁性小珠。

材料

免疫磁测定选择的 $CD34^+$ 细胞（基本方案）
RPMI 培养基，含 1%（*m/V*）人血清白蛋白（RPMI/1% HSA）
2500U/ml 木瓜凝乳蛋白酶（Chymodactin，Baxter）
Beckman GS-6R 离心机，GH3.7 转子或相等物

1. 在 RPMI/1% HSA 中重悬免疫磁测定选择的 $CD34^+$ 细胞。室温下 400*g* 离心 5min，再重复两次。
2. 用 1.8ml RPMI/1% HAS 重悬细胞并加 200μl 2500U/ml 的木瓜凝乳蛋白酶（总共 500U）。在室温孵育 15min。像第一步那样洗细胞两次。
3. 根据分析方法用培养基重悬细胞。

支持方案 4　由骨髓建立骨髓间质细胞单层

材料（标√的条目参见附录 1）

滤网用于过滤消化的骨髓或骨髓抽提物
√DOM
√PBS
Trypsin/versene solution（Bio-Whittaker）
√HBSS
√D10HG medium
√BBMM
$25cm^2$ 和 $75cm^2$ 的培养瓶，瓶盖上带有 0.2μm 的通气孔（Costar）
铯放射源（如 Gammacell 1000，Nordion International）

1. 从过滤骨髓的网筛上收集骨小梁，让其通过重力作用自然沉降。

如果没有滤网可以用 Ficoll-Hypaque/Percoll 试剂做密度梯度离心（基本方案，

第 2～8 步)，下接第 3 步。冻存非附着的造血细胞（支持方案 10)。

2. 将骨小梁接种在加有 15ml DOM 的 $75cm^2$ 的培养瓶中，37℃孵育。
3. 接种后 2～12h，完全弃去未附着的细胞。重新加入 15ml DOM，将培养瓶放回培养箱。
4. 当间质细胞汇合度达到 80%，弃去原培养基，用 15ml PBS 洗，加 2ml 胰酶/乙二胺四乙酸，轻拍瓶壁，轻轻晃动使其完全覆盖细胞层，弃去多余的胰酶，留约500μl。37℃孵育 10～15min，每 3～4min 晃动培养瓶使细胞层表面被完全覆盖。
5. 每瓶用 45ml DOM 重悬细胞，按每瓶 15ml 转移至 3 个新的 75cm 组织培养瓶。弃去原培养瓶。继续培养间质细胞至汇合度 80%，再次传代。
6. 重复一次第 4～5 步，产生第 3 代间充质细胞。如果细胞层不是同质的间质细胞群体，继续传代 3 次。
7. 用 HBSS 彻底清洗细胞以除去残留血清，消化 3～6 代 80%汇合度的间质细胞，用 10ml D10HG 培养基重悬细胞。
8. 用 2000Rad（20Gy）的辐射强度照射细胞。将每瓶中的细胞分别接种到 6 个装有 BBMM 的 $25cm^2$ 的培养瓶中（每瓶含约 2×10^5 个细胞），瓶盖上有气孔。利用间质细胞做转染（基本方案，第 1 步）或作为饲养层细胞长期培养骨髓（基本方案，第 30 步）。间质细胞可在照射后两周内使用。

支持方案 5　选择培养基和某些成分

许多用于人的骨髓培养的试剂都对造血细胞有非特异性的毒性，尽管它们对其他种类的细胞生长是可取的。因此，即使是组织培养，也需要最佳试剂成分的浓度。例如，确定甲基纤维素、FBS、BSA、G418 的浓度。

材料（标√的条目参见附录 1）

待测的不同剂量的样品
√甲基纤维素培养基，不含待测成分
$CD34^+$ 的祖细胞（基本方案，第 10～15 步）
35mm×10mm 方格的培养皿（Nunc）

1. 加入合适数量不同成分不同剂量的待测样品到合适体积的甲基纤维素培养基中以获得所需要的终浓度。如果细胞没有用适合的载体转染以筛选，不要在培养基中加入 G418 或其他选择性的成分。
2. 在 35mm×10mm 方格的培养皿的每个样品孔分配 1ml（2 倍或 4 倍）培养基。每孔加入 500～1000 $CD34^+$ 的祖细胞，混匀。培养 14d。
3. 克隆计数（cfu；基本方案，第 32 步)。G418 筛选转染了带有 *neo* 基因的载体的造血祖细胞时，以未转染或假转染的细胞作为对照。
4. 选择最佳的剂量或制剂以获得最大数量的混合谱系克隆。选择 G418 的最佳剂量使转染的细胞群形成最大数量的 cfu，同时杀死完全未转染细胞。

支持方案 6　从培养物接种克隆形成细胞

在间质细胞克隆形成实验中避免污染很重要。尽管经过照射，间质细胞在甲基纤维

素培养基中仍以较慢的速度分裂。

材料（标√的条目参见附录 1）

长期培养的骨髓培养物（LTBMC），接种后 5 周（基本方案，第 31 步）或者转染后的培养物（基本方案，第 23 步）

Trypsin/versene solution（Bio-Whittaker）

√LBMM

√甲基纤维素培养基

用于免疫选择的磁性设备（如 MPC-1；Dynal）

$25cm^2$ 的培养瓶，瓶盖上带有 0.2μm 的通气孔（Costar）

Beckman GS-6R 离心机和 GH3.7 转头（或等效的）

35mm×10mm 方格的培养皿（Nunc）

1. 用胰酶/乙二胺四乙酸消化接种 5 周后的间质细胞层。用吸管剧烈吸打，使细胞团块散开。如果巨噬细胞内含有免疫磁珠（通过吞噬），用磁部件除去。
2. 接种细胞到新的 $25cm^2$ 组织培养瓶。孵育 1～2h。用培养基温和冲洗附着的细胞层（勿使培养基直接喷射到细胞层上），收集未贴壁细胞，将含有未贴壁细胞的培养基转移到一个新的 $25cm^2$ 组织培养瓶，孵育 1～2h，弃去前一个培养瓶。
3. 温和冲洗再次收集未附着细胞。将培养基转移至 15ml 离心管中，400*g*，室温离心 5min。用 1ml LBMM 重悬沉淀并计数（附录 31）。接种 25 000～50 000 个细胞至 35mm×10mm 方格的培养皿，每孔加入添加了补充成分（基本方案，第 25～28 步）的甲基纤维素培养基 1ml。

   如果用来接种的细胞数太少，可能有以下原因：间质细胞层汇合度太大（因此营养被消耗尽）；换液次数太少（当营养缺乏时，祖细胞倾向于分化成巨噬细胞）；或者在 5 周的培养中使用了 IL-3，IL-3 有驱动早期的增殖和终末分化的作用。因此，最好只在转染时使用 IL-3。

支持方案 7　制备单个 cfu 全细胞裂解液用于 PCR

虽然全细胞裂解的程序更加便捷，以抽提的 DNA（支持方案 8）为模板的 PCR 则能获得更好的重复性的结果。PCR 对阳离子浓度敏感，而全细胞裂解液中的离子强度随原始克隆中的细胞数而变化，因此能影响 PCR 的结果。

要证实每一个 cfu 都是由一个且只带有一个前病毒整合单元的造血组细胞而来，可以采用反向 PCR 技术（支持方案 8）。

材料（标√的条目参见附录 1）

甲基纤维素培养基培养的 cfu

√PBS

√RBC 裂解液，仅裂解 cfu 中的成红细胞

√全细胞裂解液

10mg/ml 的水溶蛋白酶 K（Sigma）

倒置差相显微镜

20μl 至 200μl 无菌的 pipet tips

沸水浴

1. 将培养皿置于倒置差相显微镜的载物台上。用 20～200μl 无菌的 pipet tip 挑取单克隆，使获得的细胞数≥200，培养基在 20～40μl。每挑一个克隆更换 tip。记录含有成红细胞的克隆（它们需要不同的裂解液，第 4 步）。

   如果克隆来源于 FACSVantage（Becton Dickinson Immunocytometry）的细胞自动分选单元（ACDU）自动分选到 96 孔板的单个的 cfu，细胞可直接用 PBS 洗脱下来。用此法分离单克隆更加方便，且能交叉污染。

   对于一些特殊的细胞，在 96 孔板周围的孔加上水，以保持湿度。

2. 在 1.5ml 离心管中加入 1ml PBS，将 tip 中吸入的克隆转入其中，并反复吸打冲洗。室温孵育 1h 使甲基纤维素溶解。
3. 室温，10 000r/min，离心 5min。小心移去上清。再次点离，底部可见一三角状的沉淀物。小心吸去残余液体，留≤10μl，防止细胞丢失。可在－20℃储存。
4. 如果克隆中包含发育中的成红细胞（BFU-E 或 CFU-MIX；基本方案，第 32 步），加 200μl RBC 裂解液，用 tip 打匀。3000r/min 离心 2min。如果沉淀仍有红色，重复裂解过程。当沉淀变白，用 PBS 洗一次。
5. 用 20μl 全细胞裂解液重悬沉淀。加 2μl 蛋白酶 K。56℃孵育 1h。如果克隆较大，（如≥2000 个细胞），30min 后再加 2μl 蛋白酶 K 继续消化。
6. 生物裂解 10min。用于 PCR 以前将全细胞裂解液储存于－20℃（一般每次反应用 1～2μl 裂解液）。

支持方案 8　单克隆的整合分析

用反式聚合酶链反应（PCR）鉴定克隆的载体整合模式见图 13.4.2（或 Nolta *et al.*，1996）。

材料（标√的条目参见附录 1）

分离的单克隆

√蛋白酶 K 消化缓冲液

10mg/ml 的水溶蛋白酶 K（Sigma）

√25∶24∶1（*V/V/V*）苯酚/氯仿/异戊醇

20mg/ml 糖原

√10mol/L 乙酸铵

100%和 70%（*V/V*）的乙醇

√TE 缓冲液，pH7.5

0.1mol/L 亚精胺（Sigma）

React 2 缓冲液（Life Technologies）

5U/μl *Taq* Ⅰ限制性内切核酸酶（Life Technologies）

5U/μl T4 DNA 连接酶和 5×缓冲液（Life Technologies）

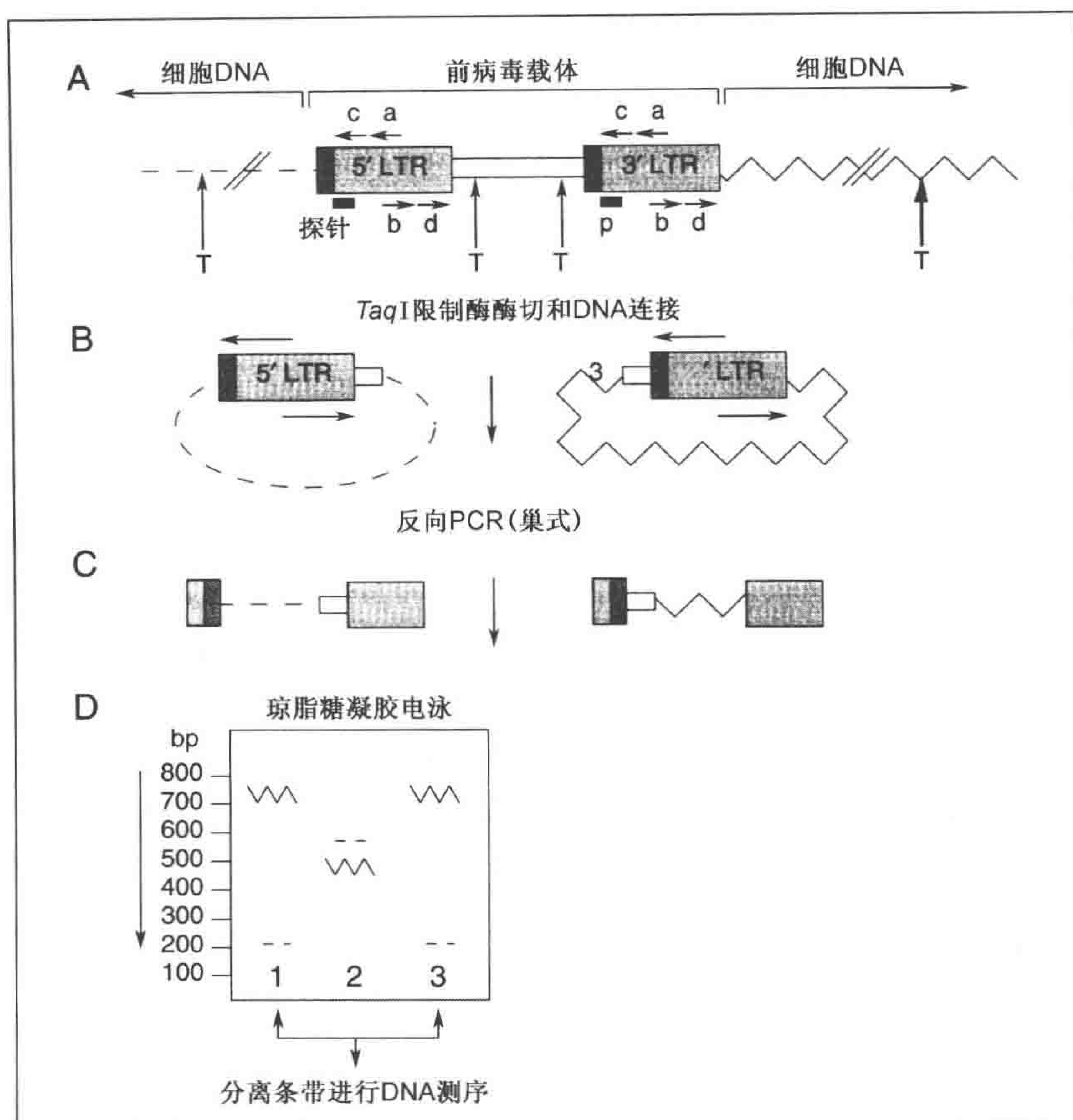


图 13.4.2　反向 PCR 鉴定克隆的载体整合模式。基因组 DNA 由甲基纤维素培养的各个克隆抽提。A. 用 *Taq* Ⅰ 切割 DNA，该酶在载体序列的每个长末端重复序列（LTR）内侧切割一次，而且在整合的载体侧翼的人细胞基因组 DNA 中最近的 *Taq* Ⅰ 识别位点上切割。这样形成的两个片段都包含一个完整的 LTR 和一段不同大小的人 DNA，但片段长度对每一个前病毒整合的克隆具有特异性。B. 被剪切的 DNA 片段自连。C. 进行两轮循环的巢式 PCR，第一轮循环用引物 INVa（a）和 INVb（b），第二轮循环用引物 INVc（c）和 INVd（d），都从 LTR 末端向侧翼的细胞基因组 DNA 由内而外的扩增。D. PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳分离，电泳迁移率相似的条带分离后测序证实。

50pmol/μl PCR 引物（Operon）：

INVa：5′-AGGAACTGCTTACCAACA-3′

INVb：5′-CTGTTCCTTGGGAGGGT-3′

INVc：5′-TCCTGACCTTGATCTTGA-3′

INVd：5′-CTGAGTGATTGATCTGA-3′

√10×PCR 扩增缓冲液（Perkin-Elmer）

√25mmol/L $MgCl_2$

√2mmol/L 4 dNTP 混合物

5U/μl ApliTaq DNA 连接酶（Perkin-Elmer）

SeaKem LE 琼脂糖（FMC Bioproducts）

NuSieve agarose（FMC Bioproducts）

1×10^7 cpm [^{32}P] ATP 末端标记的寡核苷酸探针（附录 3E），标记 LTR 序列：

5′-GGCAAGCTAGCTTAAGT-3′

Circumvent Thermal Cycle Sequencing Kit（New England Biolab）

12～15℃，56～65℃水浴（或循环变温加热器应用相应程序）

循环变温加热器和适宜的 PCR 管

尼龙膜（如 Biotrace；Pall Biodyne）

无菌的解剖刀

Spin-X columns（Costar）

1. 选择单个的分离较好的 cfu。沉淀细胞，裂解红细胞（支持方案 7，第 1～4 步）。用 200μl 包含 10μg 蛋白酶 K 的蛋白酶 K 消化缓冲液裂解沉淀（100～1000 个细胞）。56℃孵育 2h。
2. 用 200μl 25∶24∶1（*V/V/V*）苯酚/氯仿/异戊醇抽提裂解物。加 2μg 糖原，18μl 10mmol/L 乙酸铵和 500μl 100%乙醇。－20℃反应≥2h，或者干冰/乙醇混合物中，10min。
3. 10 000r/min 离心 5min。除去上清液，用 70%乙醇洗沉淀。用 benchtop 使沉淀干燥 1～2h（不要用真空泵），用 25μl TE 缓冲液重悬。
4. 准备 *Taq* Ⅰ 消化混合物：

   3μl 0.1mol/L 亚精胺；

   10μl React 2 缓冲液；

   2μl 5U/μl *Taq* Ⅰ 限制性内切核酸酶；

   75μl H_2O。

   加入 2μl 重悬物，65℃孵育 2h。孵育 1h 时加入 2μl *Taq* Ⅰ。
5. 取 8μl 消化的 DNA 加入 2μl 5×T4 DNA 连接酶缓冲液。56℃加热 14min。静置 15min 使之冷却。加入 1μl 5U/μl T4 DNA 连接酶，在 12～15℃孵育 2h。
6. 混合等体积的 50pmol/μl INVa 和 INVb 引物（INVa+INVb 混合物）。混合 2 体积的 10×PCR 扩增缓冲液和 3 体积 25mmol/L $MgCl_2$（PCR 缓冲液标准混合物）
7. 准备第一个循环的 PCR 反应混合物（适用倍增反应，multiply by *n*+1）：

   5μl PCR 缓冲液标准混合物；

   5μl 2mmol/L 4 dNTP 混合物（每种 dNTP 终浓度 0.2mmol/L）；

   0.5μl 5U/μl ApliTaq DNA 连接酶；

   1μl INVa+INVb 混合物。
8. 在 PCR 管里加入 11.5μl 第一轮的 PCR 反应混合物。加 36.5μl 水和 2μl 环化 DNA（第 5 步），上层覆盖 50μl 矿物油。以下面的程序在循环变温加热器上扩增：

第一个循环：	5min	95℃（变性）
	2min	50℃（退火）
	4min	72℃（延伸）

29 个循环：　1min　　95℃（变性）
　　　　　　2min　　50℃（退火）
　　　　　　4min　　72℃（延伸）

9. 混合等体积的 50pmol/μl INVc 和 INVd 引物（INVc+INVd 混合物）。进行第二轮巢式 PCR，除了以 2μl 第一轮 PCR 产物为模板，1μl INVc+INVd 混合物为引物外，反应混合物相同。
10. 2%（*m/V*）凝胶（1%SeaKem LE 琼脂糖和 1%NuSieve 琼脂糖）电泳检测 PCR 结果（每泳道 15μl 样品），将条带转移到尼龙膜，用标记 LTR 序列的 [^{32}P] ATP 末端标记的寡核苷酸探针杂交（附录 3G）。
11. 为证实克隆的相同整合模式（条带有相似的分子质量），以第二轮反应的混合物再次扩增第一轮 PCR 的产物，做 5 管。用 1%（*m/V*）的琼脂糖凝胶电泳检测，每道点样 15μl，共 10 道。用无菌的解剖刀小心地切下条带，放入 Spin-X 柱离心两次，每次 5min，回收琼脂糖中的 DNA。
12. 沉淀 DNA，用 8μl TE 缓冲液重悬。以 1μl 反向 PCR 引物 INVc 和 Circumvent Thermal Cycle Sequencing Kit 测序（Nolta *et al.*，1996）。

支持方案 9　收获细胞以分析长期的骨髓培养物

每周更换培养基时收集部分长期骨髓培养物（LTBMC）的细胞（约 1×10^6 个细胞/样品），沉淀后，用 10ml PBS 洗一次以备抽提核酸或蛋白质做进一步分析。

对于 RNA 抽提，沉淀用 200μl PBS 重悬。加入 4mol/L 异硫氰酸胍置于冰上裂解。裂解前保证细胞团块被打散至匀浆状。由于异硫氰酸胍不能使 RNase 失活，所以裂解的同时要防止 RNA 降解。含 RNA 溶胞产物抽提前置于－70℃保存。RNA 抽提，凝胶电泳，核酸转染按标准方法（见单元 10.3 和附录 3G 和 3H）。

对于抽提 DNA 以备 Southern blot 杂交（附录 3G），来源于培养物的非附着细胞离心后，PBS 洗一次，可以以沉淀的形式储存于－20℃数年，产生的 DNA 也足够用于 Southern blotting 或 PCR。

对于抽提蛋白质以备分析，沉淀用 10ml PBS 洗 4 次。最后一次离心后，除去 PBS。再次短暂离心，使 15ml 离心管壁上的残留液体集中，用 tip 吸去。细胞可以以干燥沉淀的形式于－70℃保存。即使沉淀残余的 100μl PBS 也会稀释蛋白溶胞缓冲液，影响酶测定。如果细胞可以在 1h 内处理，可置于冰上待用。

支持方案 10　冻存造血细胞

材料（标√的条目参见附录 1）

骨髓，脐带血，外周血细胞
自体血浆或热灭活人 AB 血浆
√冻存培养基，4℃
2ml 冻存管（Nalge）
速率可控的细胞冷藏箱

液氮罐

1. 用未稀释的自体血浆重悬骨髓、脐带血或外周血细胞，使密度为 4×10^7 个细胞/ml。富含 CD34 的细胞浓度为 1×10^7 个细胞/ml。
2. 每个 2ml 冻存管加入 1ml 细胞，在控速细胞冷藏箱冷却到 6℃前，将冻存管置于冰箱或冰上。
3. 加入 1ml 冷的冻存培养基混合。将冻存管置于控速细胞冷藏箱，以 −1℃/min 的速率冷却。当冷冻循环完成后（达到−90℃），将冻存管置于液氮中保存。

如果没有控速细胞冷藏箱，细胞可放在液氮罐的气相里过夜，然后转移到液相（此法细胞的存活力略低）。

支持方案 11　造血细胞的复苏

材料（标√的条目参见附录 1）

1mg/ml DNase（Sigma）
√融解用培养基
冷藏保存的造血细胞 9（支持方案 10）
√PBS
15ml 离心管，无菌
37℃ 水浴

1. 在 15ml 离心管中加入 10ml 融解用培养基和 100μl 1 mg/ml DNase。
2. 快速融解 2ml 冻存管中冻存的造血细胞，不需离心直接转移到融解用培养基中稀释。37℃水浴孵育 1h。
3. 用 PBS 洗两次。

也可将细胞直接从冻存管移入 BBMM 培养基中使细胞团块散开。此法对大团块的细胞更适合。

参考文献：Hanenberg *et al.*，1996；Moore *et al.*，1992；Nolta *et al.*，1996

编者：Jan A.　Nolta and Donald B.　Kohn

单元 13.5　呼吸道基因给药

策略设计

呼吸道模型系统的选择

呼吸道模型系统的选择依赖于要研究的假设的不同需要的水平而定。几个模型系统为利用重组载体系统的遗传修饰提供了灵活性。这些模型系统包括①增殖的呼吸道上皮细胞培养物，②极化的呼吸道单层上皮细胞，③人支气管异种移植物和④动物模型的完整肺。人的呼吸道最适合应用于人类遗传疾病和基因治疗，因此本单元重点介绍建立人类呼吸道模型的策略。一些可能影响模型选择的因素在表 13.5.1 中列出，包括上皮细

胞的分化范围及它在遗传疾病有关的人类呼吸道细胞研究中是否必要。

表 13.5.1　呼吸道模型系统的选择

呼吸道模型系统	优点	缺点
增殖的呼吸道上皮细胞培养物(基本方案 1 和 2)	便于使用;基因转移效率明显高于其他分化的呼吸道模型	细胞未分化
极化的呼吸道单层上皮细胞(基本方案 3 和 4)	分化好;能灵活地应用于功能测定实验(如生物电性质)	需要新鲜分离的呼吸道细胞;分化的单细胞层不一
人支气管异种移植物(基本方案 5 和 6)	出色的分化,包括人类呼吸道天然分布的所有细胞类型;部分重构黏膜下层腺体;表现部分免疫应答反应	定包含体内所有细胞类型技术难度大;费用高; T 细胞相关免疫功能不全
动物模型的完整肺(基本方案 7)	能评估完整肺功能和基因给药的各方面	非人源;呼吸道细胞类型可能与人类不同

载体系统的选择

用于遗传修饰呼吸道模型系统的载体系统的选择对于研究疾病生理学，呼吸道生物学，以及基因治疗的整个实验设计很重要。已经成功地用于呼吸道模型的几种载体系统包括重组腺病毒（单元 12.2)，重组反转录病毒（单元 12.4)，重组腺相关病毒（单元 12.3）和阳离子脂质体/DNA 复合物。增殖的呼吸道上皮细胞培养物的转染效率要高于这些载体转染其他分化类型的模型。每种载体系统转染分化类型模型系统的效率列于表 13.5.2，但是有些例外。例如，由于病毒基因的表达，重组腺病毒载体有较高的毒性。因此，在某些情况下，根据载体生物学的考虑，其他效率较低的基因转移方法可能更可取。对于特定的病毒载体，细胞的增殖水平能影响转染的效率，也应作为考虑的因素。而且，对于现有的一些载体系统，基因转染的效率仅受病毒有效滴度的影响。例如，浓缩反转录病毒制剂的新技术已获得了比从前更高的转染效率。本单元将介绍最为常用的呼吸道转染的病毒载体。

表 13.5.2　载体体系的选择[a]

呼吸道模型系统	基因转移的效率
增殖培养(基本方案 1 和 2)	腺病毒＞反转录病毒＞腺相关病毒
极化的单层细胞(基本方案 3 和 4)	腺病毒＞反转录病毒＞腺相关病毒
人支气管移植细胞(离体基因转移;基本方案 5 和 6)	反转录病毒＞腺相关病毒＞腺病毒
人支气管移植细胞(体内基因转移;基本方案 5 和 6)	腺病毒＞反转录病毒＞腺相关病毒
动物模型的肺(基本方案 7)	腺病毒＞腺相关病毒＞反转录病毒

a. 其他影响载体选择的考虑,像整合的潜力、转基因表达的稳定性以及炎症反应的潜力,在 CPHG 第 12 章有描述。

报告基因的选择

当鉴定一个基因转染效率时存在一个重要的问题，那就是多种载体系统表达编码的

转染基因的效率。这时就会使用一些报告基因，比如常用的有氯霉素乙酰转移酶（CAT）、萤火虫萤光素酶、人生长因子、β-葡糖苷酸酶、绿色荧光蛋白（GFP）、β-半乳糖苷酶（β-gal）和碱性磷酸酶（AP）。其他报告基因的讨论可以参见 CPMB 第 9 章。在细胞水平上当转基因表达的组蛋白评价水平比测定基因转染更有效时，以上提到的最后三个报告基因是最常用的。GFP 提供了一种额外有效的优势，就是允许通过可见细胞来测定转基因的表达水平。这对于非侵入式的基因传递和转基因表达水平的动力学测定是非常有效的。然而，这种方法对于原代培养的细胞模型的应用作用是非常有限的。在选择报告基因时另一种重要的因子是内源性酶活性水平。虽然实验方法为降低背景染色而设计的，但 β-gal 和 AP 都在上皮细胞中有内源性的活性。有几种方法最小化了背景染色的复杂性，包括定义的、短反应时间、抑制作用和内源酶活性的失活和阴性对照载体的严格使用。

注意：包括活体动物的所有实验方案应该符合 NIH 和研究机构或大学指导意见的要求，获得机构性动物保护和使用委员会（IUCAC）的批准。

注意：所有的与活体细胞有接触的试剂和实验仪器都必须是无菌的，灭菌方法应该相应地使用。所有的培养箱（除有特别说明的）都是增湿的 37℃、5% CO_2 培养箱。

基本方案 1　分离人气管表皮细胞

材料（标√的条目参见附录 1）

人肺（置于冰上），来自于肺移植捐献者（较好）或尸体解剖的肺（死后 6h 内获得）

√培养基 A

蛋白酶ⅪⅤ型（如 Sigma），4℃

√FBS

Ham F-12 培养基（Life Technologies），含或不含 10%FBS，4℃和 37℃

√培养基 B，37℃

√培养基 C

0.1%胰酶/EDTA（Life Technologies）

√胰酶抑制缓冲液

冷冻保存培养基：培养基 C，含有 10%（V/V）二甲基亚砜和 10%（V/V）FBS，4℃

解剖器具包括钳状骨针，解剖刀和止血钳

100mm 和 150mm 组织培养皿（未包被塑料）

15ml 和 50ml 离心管

平台振动器

桌面离心机

$3cm^2$ 一片的 500μm 镍铬合金或铜金属丝网，无菌的

2ml 冷冻管（如 Nunc）

1. 在冰上的组织培养罩中从人肺部切开支气管，将气管置于 4℃的培养基 A 中。可以

很容易地从第 5 支气管中分离出。

2. 将分离出的气管置于盛满培养基 A 的 150mm 组织培养皿中。从气管外部除去多余的外膜并将气管组织切成 1～2cm 的环状。将气管环横向切开暴露出气管表面。去除多余的黏液分泌物。
3. 将样本放入含有 35ml 培养基 A 的 50ml 离心管中（加入足够的组织使总体积达到 45ml），4℃振动孵育 30min。重复洗 6 次。如果组织在收获时已经严重感染，就需要增加润洗时间，总共为 5～6h。
4. 将样本放入一个新的离心管内，管内含有 35ml 培养基 A 和 0.1%（*m*/*V*）蛋白酶 XⅣ型。4℃孵育 36h。加入 FBS，终浓度为 10%（保证管中总量小于管体的 75%），轻轻振动 30s。
5. 静置 1min 使得组织沉到管底。吸出培养基（含有分离的气管细胞），转入一个置于冰上的新的离心管中，将剩下的组织放入到 100mm 的组织培养皿中。
6. 用解剖刀的顿边刮气管表面，用 4℃ Ham F-12 培养基/10% FBS 润洗，将洗下的细胞加入到 50ml 离心管中。如果需要的话，将气管组织片保存在－80℃用于基因分型检测。
7. 混合所有的含有上皮细胞的上清，4℃，约 300*g* 离心 5min。弃去培养基，用总量为 10ml 的 Ham F-12 培养基/10% FBS 重悬细胞。用无菌的 500μm 金属丝网过滤到一个 15ml 离心管中。
8. 再用同样的培养基洗两遍细胞，离心收集。在最后一次离心前，移除 10μm 等分量的细胞悬液，用台盼蓝计数存活细胞的释放总量（附录 3Ⅰ；一般一叶组织的释放量为 2×10^7～4×10^7 个细胞）。不要计入红细胞数。
9. 用 10ml 37℃培养基 B 重悬最终的细胞沉淀，接种 1×10^6～2×10^6 个细胞/100mm 组织培养皿，每个皿中加入 10ml 培养基 B。培养 24h。如果使用囊性纤维化（CF）细胞，在最初的 24h 加倍抗体的浓度。
10. 吸出未贴壁的细胞，用 37℃ Ham F-12 培养基洗两次贴壁细胞。用新鲜的培养基 B 培养细胞，培养 48h（重度污染的细胞培养 72h）。

    两性霉素 B 对细胞是有高度毒性的，如果不是真菌或细菌污染的问题，加药时间控制在最小值。从器官移植手术室直接获取组织（较病理实验室）能降低真菌污染。

11. 用培养基 C 培养细胞（这一时期，上皮细胞克隆在扩增，可见）。每 3 天换新鲜的培养基 C。通常情况下，细胞是为冻存、传代或移植到异种模型做准备的（基本方案 5）接种后 5 天（约 80%汇合度）。不要让汇合度超过 80%，否则会开始分化。
12. 可选择：移去培养基，用 5ml 0.1%胰酶/EDTA 在 37℃下孵育 1～3min，同时紧密关注细胞是否脱落（附录 3Ⅰ）。加入 5ml 胰酶抑制缓冲液。轻轻敲打平板，收集细胞。4℃，300*g* 离心 5min，用培养基 C 洗两次。用培养基 C 按 1∶5 稀释传代。可参见第 11 步。

    通常，细胞可以扩增一次而不丧失在异种模型中的分化能力。

13. 用胰酶/EDTA 处理细胞，轻轻敲打平板收集细胞。4℃，300*g* 离心 5min，用 1ml 4℃细胞冻存液（每 100mm 平板的细胞）重悬细胞沉淀。等分成 1ml 加入到 2ml

的冻存管中。在－80℃冻存过夜，在转入液氮中（附录 3I）。

14. 用冻存细胞时，在 37℃下快速解冻，并立即接种到 37℃的生长培养基中。没有必要移入到 DMSO 中。

基本方案 2　转染原代气管上皮细胞

材料（标√的条目参见附录 1）

8mg/ml 聚凝胺（Sigma），用水溶解（分装后储存在－20℃）

100mm 原代气管上皮细胞培养皿（基本方案 1），新鲜分离的或是传代一次

Ham F-12 培养基（Life Technologies）

√培养基 C

0.45μm 针筒过滤器，只用于反转录病毒转染

12 000～14 000Da MWCO 分析膜（Life Technologies），只是用于 rAAV 转染

用反转录病毒转染

1a. 从汇合的单层克隆 ΨCrip 生产细胞或其他经典的技术，包括瞬时转染（单元 12.4）获取反转录病毒上清液。对于克隆生产细胞系，在收获前 16～18h 加入 5ml DMEM/10%小牛血清生长培养基到 100mm 汇合的单细胞层。

2a. 将反转录病毒上清通过 0.45μm 过滤器，除去细胞残片。加入 8mg/ml 聚凝胺，最终浓度是 2μg/ml。

3a. 在接种后的第二天（约 10%汇合度），从新接种了分离出的气管上皮细胞 100mm 的培养板中移去培养基，加入 10ml 反转录上清。孵育 2h。用 Ham F-12 培养基洗细胞两次，再加入激素确定的培养基 C，继续孵育。在后面的几天里最多转染细胞三次。

转染后，细胞可用来产生遗传修饰的气管上皮细胞用于支气管的异种嫁接（基本方案 6）。通常，1×10^6 cfu/ml 的反转录病毒滴度能够转染原代气管细胞，在三次连续的转染后获得 10%～30%的转染效率。

利用 rAAV 转导

1b. 制备并纯化 rAAV（单元 12.3）。用 12 000～14 000Da MWCO 透析膜 4℃过夜透析 500ml Ham F-12 培养基。室温下，将 5×10^9 rAAV 的 DNA 颗粒（一般 5～100μl）与 1.5ml 培养基 C 混匀。

2b. 取一 100mm 培养皿的初级气管上皮细胞（新鲜分离的或传代一次的），约 5×10^5 个细胞去除生长培养基。加入 1.5ml rAAV/培养基 C 混合物，孵育 1h，每隔 5～10min 摇动一次。加入 5ml 培养基 C 后继续再孵育 24h。

一般单次转染能产出 25%转基因表达的细胞。为提高基因转移水平转染可以在连续几天内进行提高。

基本方案 3　生成极化的单层气管上皮细胞

分离新鲜的未培养的处于最高分化水平的气管细胞。传代一次后的细胞效果也不错，这主要取决于用来分离原代细胞的气管组织的质量。

材料（标√的条目参见附录 1）

冰乙酸
胶原Ⅵ，溶于酸，来源人胎盘（Sigma），最高效能和最低细胞毒性已知
√PBS
√5%血清气管培养基
√Ussing chamber 培养基
0.2μm 过滤器（Millipore Millex GS 或等效的 Nalgene 过滤器）
12mm Millicell-HA 培养板嵌入物（Millipore）
100mm 组织培养皿
桌面离心机
24 孔培养板

1. 将 50μl 冰乙酸加到 25ml 蒸馏水中，加 12.5mg 人胎盘胶原Ⅵ，轻轻搅拌 37℃溶解 30min。用蒸馏水 1∶10 稀释，通过 0.2μm 过滤器（终浓度为 50μg/ml；4℃保存不超过 1 个月）
2. 将 500μl 稀释的胶原加到 12mm Millicell-HA 培养板嵌入物表面，室温孵育 18h 以上（小于 1 周）进行包被。
3. 在使用前，去除多余液体胶原。自然风干 3～5min。用 PBS 洗一次，5%血清气管培养基洗两次。
4. 分离出原代气管上皮细胞（基本方案 1，第 1～8 步）或采用第一代细胞（基本方案 1，第 1～12 步；没有那么有效）进行第 6 步。
5. 轻轻吹打重悬细胞，接种到 100mm 组织培养皿，孵育 1～3h 使成纤维细胞贴壁。收集上清液，上清液中包含未贴壁的原代上皮细胞。台盼排除法计数活细胞数（附录 3I），300*g* 离心 5min。
6. 在 4 孔培养板的每个孔内加入 500μl 5%血清气管培养基，每个孔放置一个胶原包被的 Millicell 嵌入物。在总体积为 100～500μl 的 5%血清气管培养基中，每个嵌入物上接种 3×10^5 原代气管细胞（5×10^5 个细胞/cm^2）（图 13.5.1）。孵育 24h。
7. 去除顶端面（黏膜的）的培养基，在基底面（基底外侧的）用 Ussing chamber 培养基取代 5%血清气管培养基。细胞在气-液界面继续孵育。在培养的第一周内 CO_2 保持 7.5%以提高在交叉膜阻力较大情况下生成单细胞层的效率。在培养 2 周后可以得到分化好的单层气管上皮细胞。典型的培养显示穿越上皮的阻力达到 1000ohm/cm^2 以上。

基本方案 4　基因转移极化气管上皮细胞

CPHG 单元 13.9 讲述了一些可提高转染效率的改进方法。

材料（标√的条目参见附录 1）

√HBSS，只用于重组反转录病毒
25%、40%（*m*/*V*）溶于 HBSS 的蔗糖溶液，只用于重组反转录病毒

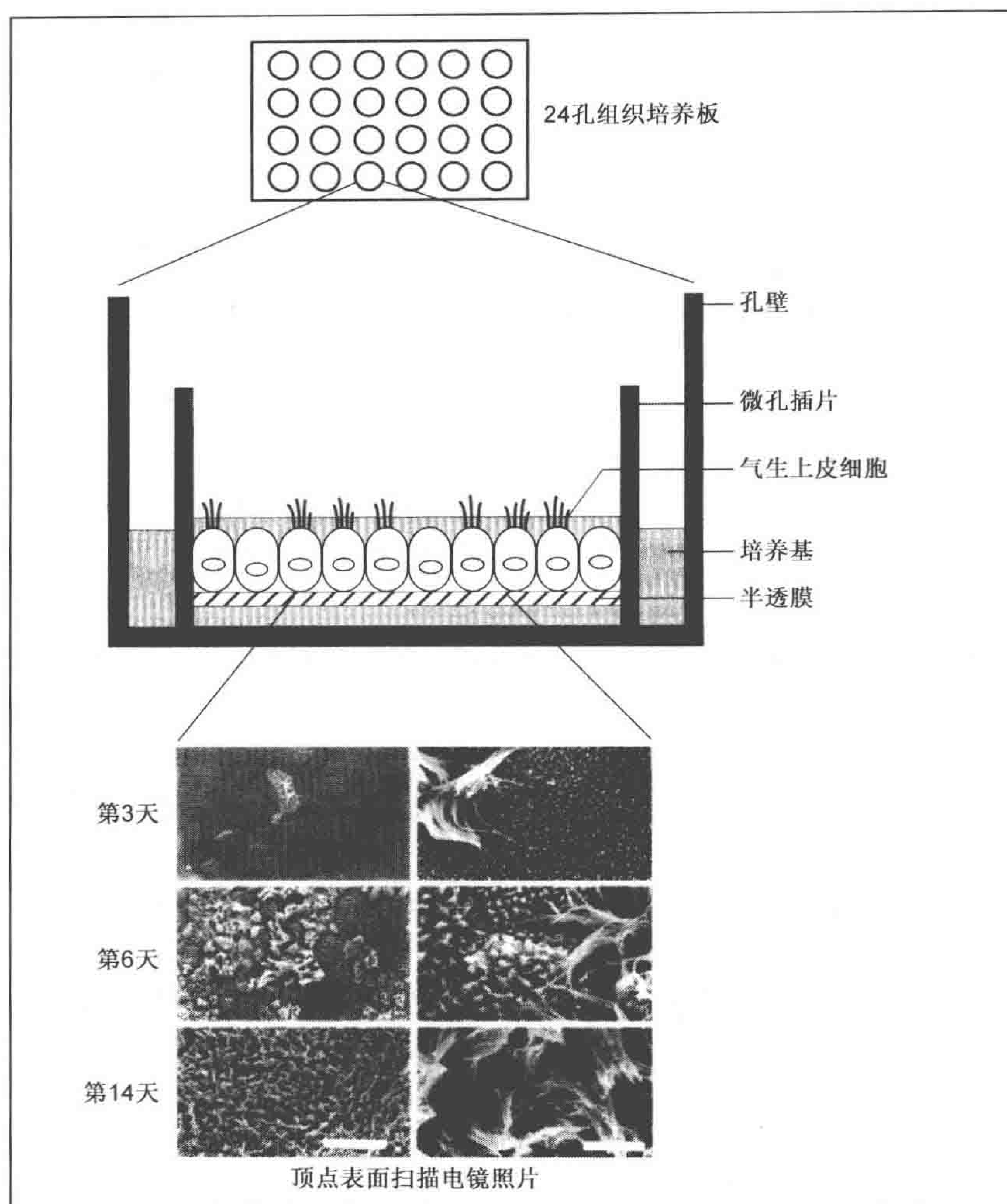


图 13.5.1　极化的气生上皮细胞体外培养。原代的单层原代气生上皮细胞生长在胶原包被的微孔细胞培养插片上（孔径 0.4μm，总生长面积为 0.6cm²），然后接种于 24 孔组织培养板上。支持的滤膜是硝酸纤维素酯和乙酸的混合物，然后再用液体胶原包被。培养过程中，基底的侧面暴露在组织培养基中，同时顶面接触空气。扫描电镜图片由 Zabner 等惠赠（1996）并得到美国微生物学会的同意。比例尺：右，5μm；左，37.5μm。

√乳糖保存缓冲液，只用于重组反转录病毒

√Ussing chamber 培养基

长有极化气管上皮细胞的 Millicell-HA 培养板嵌入物（基本方案 3）

Ham F-12 培养基（Life Technologies），只用于重组腺相关（rAAV）病毒

√PBS，只用于重组腺相关（rAAV）病毒

0.45μm 过滤器（Millipore，只用于重组反转录病毒）

带 SS-34 转子的 Sorvall RC-26 Plus 离心机（或等效的），4℃，40ml 离心管，只用于重组反转录病毒

Beckman 带 SW 41 转子的离心机（或等效的），4℃，SW 41 离心管，只用于重组反转录病毒

Filtron 100K 浓缩器（PALL），只用于重组反转录病毒

58℃水浴箱，只用于 rAAV

12 000～14 000Da MWCO 透析膜（Life Technologies），只用于 rAAV

用重组腺病毒转染

1a. 反转录病毒上清液用于基因转染研究（单元 12.4）。确保含反转录病毒培养基通过 0.45μm 过滤器。效价大于 10^8 cfu/ml。

2a. 在带有 SS-34 转子（40ml/管）的 4℃ Sorvall RC-26 Plus 离心机中 7000g 离心反转录病毒 16h。去除上清液，用 0.5ml HBSS 重悬沉淀。

3a. 在 SW41 离心管底部加入 4ml 40%用 HBSS 稀释的蔗糖，用吸管慢慢加入 25%的蔗糖形成一个 25%～40%的蔗糖梯度。将病毒悬液加入梯度的顶部，4℃，265 000g 离心 1.5h。

4a. 从界面收集病毒，按操作手册用 Filtron 100K 浓缩器渗析，将缓冲液换成乳糖储存缓冲液。病毒原液保存在－80℃（单元 12.4）。

5a. 加入 8mg/ml 聚凝胺使终浓度为 8μg/ml。用等体积 Ussing chamber 培养基与反转录病毒混匀，加 100μl 到极化气管上皮细胞的顶端表面。也可以翻转过滤器，将 100μl 病毒加到上皮的基底面。孵育 4h。

典型的反转录病毒转导是从培养的极化顶端面进行极少的基因转染，其效率为 1%～5%。

6a. 去除含病毒的培养基，将单层上皮放入普通培养条件下（顶上面有空气，底部有培养基）。

7a. 分析培养物功能或检测转基因转达。

用 rAAV 转染

1b. 通过 CsCl 三次密度超速离心纯化 rAAV（UNIT 12.3）。58℃加热 60min 失活辅助腺病毒用 12 000～14 000Da MWCO 透析膜 4℃ 过夜透析 500ml Ham F-12 培养基。

2b. 100μl Ussing chamber 培养基中混入 5～20μl rAAV。用 100μl 直接极化上皮细胞。或倒转过滤器用 100μl 感染底部。孵育 24h。

比起顶端感染，底侧感染有 100 倍的高效率（感染后，30～40d 有 1%的转基因表达）。

3b. 去除含病毒的培养基，将单层上皮放入普通培养条件下（顶上面有空气，底部有培养基）。

4b. 分析培养物功能或检测转基因转达（感染后 4d 开始检测，高峰是第 40 天）。

用腺病毒转染

1c. 一般的重组腺病毒（单元 12.2）。用 PBS 稀释腺病毒到 5×10^7 pfu/100μl（［MOI］约 50pfu/细胞）。加 100μl 到顶部极化的上皮细胞上。孵育至少 12h 以上。

2c. 去除含病毒的培养基，用 Ussing chamber 培养基冲洗顶部表面两次。使培养箱转回正常的培养条件（顶上面有空气，底部有培养基）。

3c. 分析培养物功能或检测转基因转达（转染后 3d 到达高峰期）。

在很难鉴别的上皮腺病毒转染中（转染 3d 后）将导致 50%～60%的转基因表达细胞。

基本方案 5　人类支气管异种嫁接的繁殖

人类支气管异种嫁接能从多种组织资源繁殖，包括鼻子、气管和支气管上皮。最常用的支气管异种嫁接是从气管上皮培养得到，已经在裸鼠支气管中得到（图 13.5.2）。

材料（标√的条目参见附录 1）

Fisher 344 大鼠，200～250g，雄性（Harlan BIOPRODUCTS FOR Science or Charles River Labs）

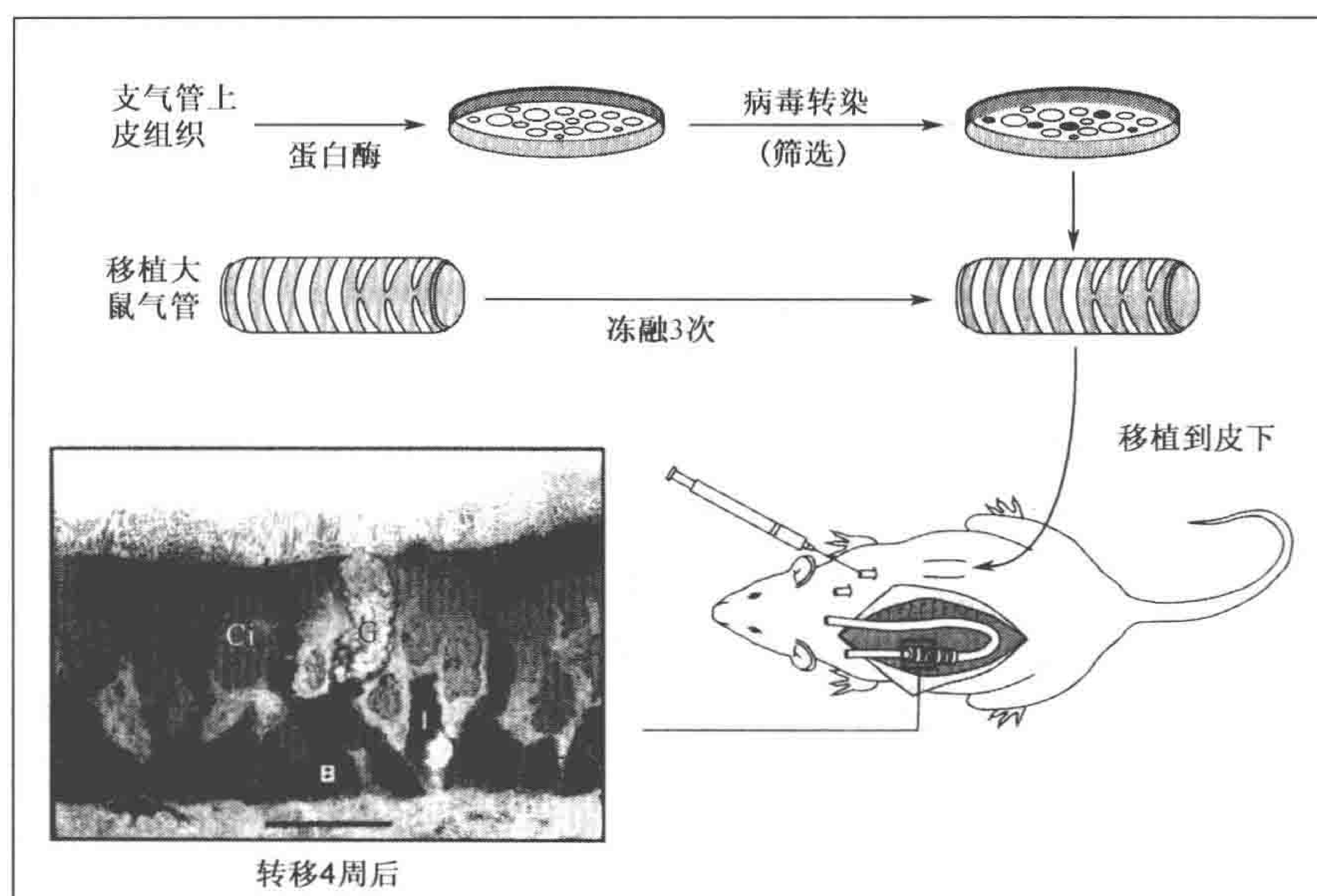


图 13.5.2　人支气管异种移植模型。来源于初级人支气管细胞的人导气管被皮下异种移植到裸鼠的气管。初级细胞体外遗传修饰通过重组逆转录病毒和腺相关病毒载体（基本方案 2），异种移植能在未经遗传修饰的初级细胞和活体基因转移研究中产生。一种完全的分化黏毛土皮组织在转移 4 周后得到。B，基底细胞；Ci，纤毛细胞；1，中间细胞；G，杯状细胞，bar=20μm。

70%乙醇（V/V）

MEM（Life Technologies），4℃

初级支气管上皮细胞（基本方案 1）约 80%融合

√培养基 C，4℃

nu/nu 无胸腺小鼠，20～25g，雄性（Harlan Bioproducts for Science）

氯胺酮

甲苯噻嗪

√PBS

聚乙烯酮碘

Ham F-12 培养基（Life Technologies），常温

硅橡胶管（0.03in. i. d. ×0.065in. o. d. ;Dow Corning）

聚四氟乙烯树脂管（0.03in. i. d. ×0.065in. o. d. ;Thomas）

转换器（0.8mm bar-to-bar connector；Bio-Rad）

直径 0.035in 的铬镍合金 A 钢线（Hoskins Msg）

100mm 的组织培养皿

气体灭菌囊（M. D. Industries）和气体灭菌设备

2ml 螺帽管（Sarstedt）

2-0 编织缝线（如 Ethicon）

止血钳

小而密封的转移容器 5% CO_2 来平衡异种移植盒

水袋

无菌的外科床单为小鼠外科手术用

小的钳状骨针（每只小鼠两个）和锋利的剪刀（每只小鼠一个），用自封闭式高压灭菌锅灭菌（M. D. Industries）

一次性皮肤缝合钉 35 针（American Cyanamid）

装小鼠的无菌袋

0.75in，21G 蝶翼静脉输液针（Terumo Medical 公司）

1. 切割异种移植盒的输液管和接头到一定长度并按照图 13.5.3A 装配。放置移植盒在 100mm 组织培养皿中。用高压灭菌锅密封并蒸汽灭菌。
2. 通过 CO_2 窒息安乐死雄性 Fisher 344 鼠，并将其固定在泡沫聚苯乙烯床上。
3. 在层流罩（或在一个干净的开放操作台上）内工作，用过量的 70%乙醇清洗小鼠的

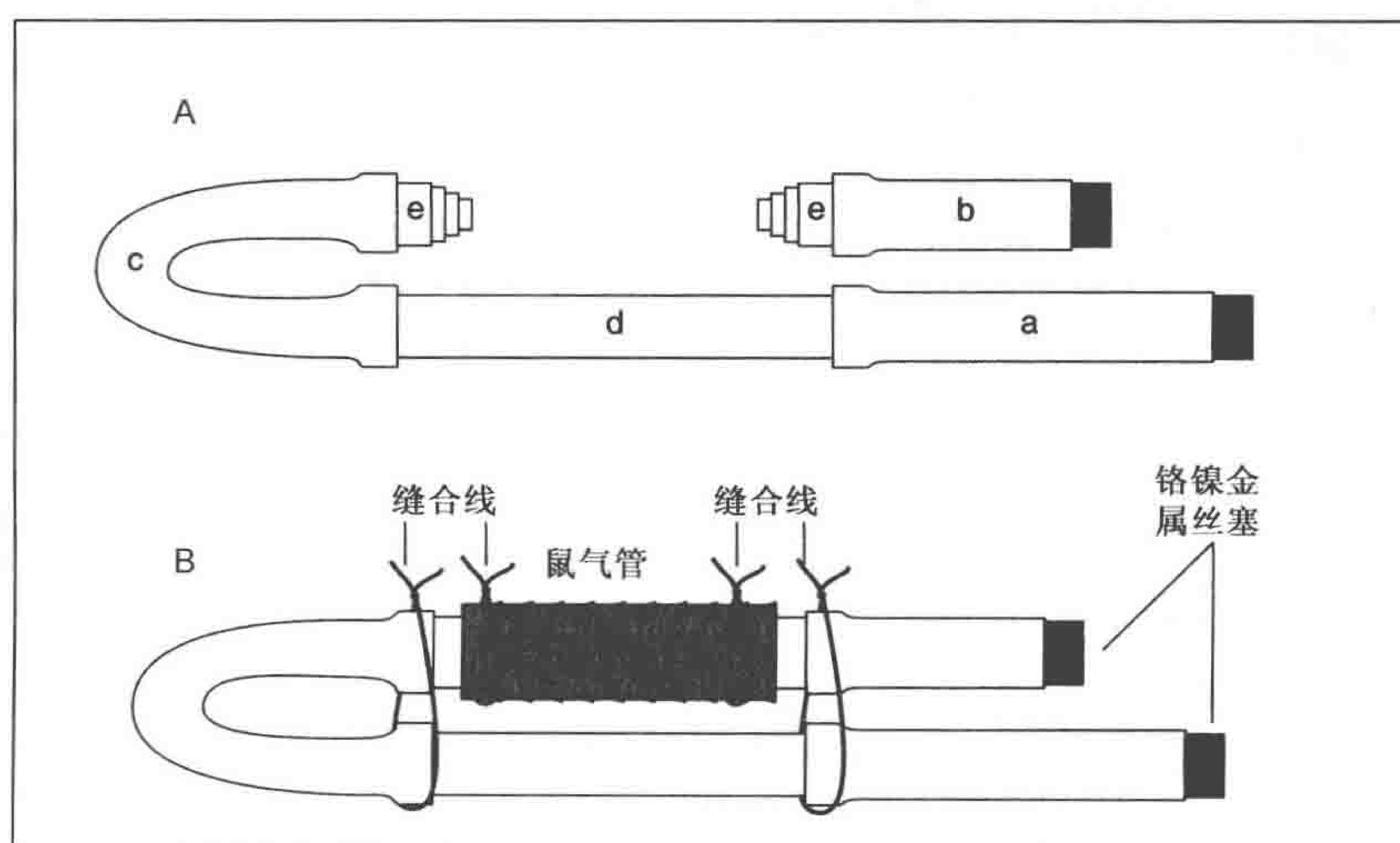


图 13.5.3 异种移植盒是由一串 A 图所示的管形材料构成，管 a，2.5cm 的硅胶管；管 b，1.9cm 的硅胶管；管 c，4.5cm 的硅胶管；管 d 是 3.2cm 的聚四氟乙烯树脂管；管 e，接头。B 图所示为缝合线将裸鼠气管结扎到管形材料上。

颈和胸并且切除从咽到龙骨状突起（咽末端的支气管分叉）的气管。不要切到动脉。立即放每个被切下的气管在隔离的 2ml 带螺帽的试管中并置于冰上直到所有的气管被收获。

4. 剥光通过 3 个冷冻巡回在 −80℃的气管上所有能存活的上皮组织并在室温解冻。清洗过多脂肪的气管并切割到合适大小（典型的是在第一和第十三气管环）。用 10ml 的冷的 MEM 冲洗每个气管内腔。按照长度配对气管并混合每对到同样的试管中。置 −80℃保存。

   以下所有的程序要在无菌的层流罩中进行。

5. 用 2-0 被编织的缝线结扎小鼠气管到被系在试管 b 上的接头如图 13.5.3B 所示。用三个接系牢缝线并将其绕在试管和气管共三次。
6. 在无菌的条件下，用 20μl 微量移液器将含有 1×10^6～2×10^6 原发的支气管气道上皮细胞的 20μl 冷的培养基 C 注射到鼠气管开放端。当细胞注射到气管时，尽可能深的将移液器 tip 头伸到气管并慢慢的撤出。
7. 当心别让细胞遗漏，结扎鼠气管的开放末端到被系在试管 C 的结头上如图 13.5.3B 所示。通过伸展它到生理长度获得鼠气管长度并用一把止血钳夹紧管 b 和管 a。剩余的两个缝线要如图 13.5.3B 要固定接头到管 d。
8. 用含 1～2ml 培养基 C 的 100mm 组织培养皿放接种细胞异种移植盒。在 37℃、5% CO_2 潮湿的培养箱中，孵育 1～2h 来平衡 pH 值。为了移植，要用到一个小的密封无菌的容器。它应该预先用异种移植培养皿孵育来维持 CO_2 浓度。
9. 通过用 PBS 腹膜内注射 100mg/kg 氯胺酮和 20mg/kg 甲苯噻嗪来麻醉雄性 *nu/nu* 无胸腺小鼠。放小鼠在一个用无菌布单覆盖的温暖的水瓶中并从高压灭菌锅中取出无菌的外科手术器械。
10. 用聚乙烯酮碘和乙醇清洗外科手术切口位点。切开 4 个切口如图 13.5.4B 所示。在小鼠的颈部切开一个非常小的切口（0.16cm）仅用来通过管子。在小鼠的胁腹切开两个 1cm 长的切口。通过剥离分离肌肉和皮肤并置异种移植盒到皮下，用钳状骨针直到异种移植管隧穿到颈部后的切口（图 13.5.4C）。
11. 用 2～3 个 U 形钉封闭每个最大的切口。用一个额外的 U 形钉来锚定每个异种移植管到管 c 的弯曲部分的皮肤处。当插入 U 形钉时，当心不要刺伤移植管（图 13.9.4C，立体箭头）。
12. 转移鼠到无菌的笼子里。确保小鼠温暖并实施监测直到它苏醒。保持小鼠隔离，因为它们可能相互咀嚼管子，并保持无病原体饲养。在更换笼子前，高压灭菌所有的笼子、食物和水。
13. 移植后前 3 周，用 0.75in，21G 蝶翼静脉输液针和 1ml Ham F-12 培养基每周清洗一次异种移植处，为了移除过多的分泌黏液，用下面的技术操作。如果有必要，用 25%～50%剂量的氯胺酮/甲苯噻嗪麻醉小鼠。
    a. 系一个 21G 针到一个移去活塞的 1ml 注射器上并注满室温的 Ham F-12 培养基。将针从异种移植物的一个末端插入管子。
    b. 将一个系有活塞的注射器蝶翼 21G 输液针插入到异种移植物的相对的一端。
    c. 通过拔第二个注射器的活塞形成负压来吸出移植物内腔中的液体。最后，吸出进

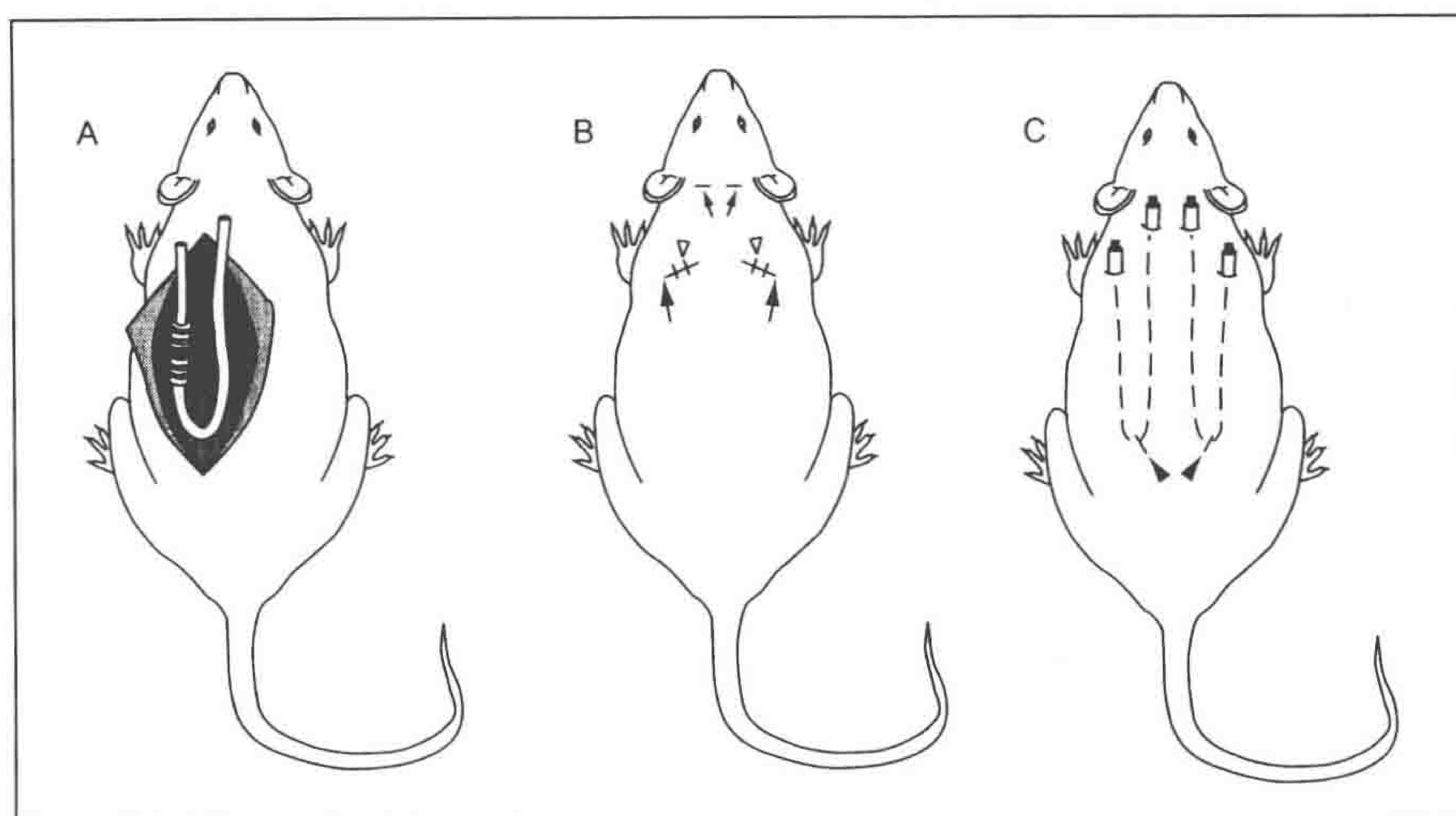


图 13.5.4　在 *nu/nu* 鼠中，支气管异种移植物的移植。A. 移植盒的皮下移植。B. 按照箭头所指，切出四个切口并用钳状骨针皮下指导异种移植盒，以便一个孔通过颈的背部存在而另一个孔通过主要的切口。按照开放箭头所指示的那样，外科 U 形钉被用来封闭切口。C. 组合的异种移植物小鼠一周后，U 形钉被去除。在面板 C 中，封闭箭头指示的 U 形钉用来维持移植盒的位置并防止皮下移位（它也可能需要留下 U 形钉 2 或 3 周）。

入异种移植物腔内的空气。

14. 3 周后，每周清洗两次异种移植物。

基本方案 6　对人类支气管移植物的转基因

材料

原初增生人类支气管细胞（用反转录病毒体外转导；基本方案 1）或用完全分化的异种移植物（用腺病毒体内转导；基本方案 5）

反转录病毒上清液（单元 12.4）或经纯化的重组腺病毒（单元 12.2）

Ham F-12 培养基（Life Technologies）

用反转录病毒体外转导

1a. 用重组反转录病毒转导原初增生人类支气管细胞（基本方案 2）。转染细胞三次为最好的转导。

2a. 胰蛋白酶处理原初支气管上皮细胞（一般接种后 5d；基本方案 1，第 12 步）并接种到异种移植盒（基本方案 5）。

3a. 移植异种移植盒到 *nu/nu* 鼠并维持异种移植物（见基本方案 5）。

4a. 分化后（一般 4 周），或者用移植物做功能检测或者收获他们用来做转基因表达的组织学分析（支持方案和 CPHG 13.9 单元）。一般来说，在最终的再生移植物中，原初细胞中的转导效率可维持。

用腺病毒进行体内转染

1b. 制备重组腺病毒，通过两个循环的 CsCl 密度梯度离心纯化，然后用葡聚糖凝胶 G50 过滤（非透析）脱盐到 Ham F-12 培养基。

2b. 立即滴入 100～150μl 纯化的病毒（5×10^{10} pfu 达到 10%的转染率）到完全分化的异种移植物管腔（移植 4 周后）的一端和插入铬镍合金线塞的异种移植物关闭端（基本方案 5）。要想达到大于 95%的转染率，每隔一天做一次 16h 的转染，共转染 3 次。

3b. 转染异种移植物 16h，然后用 1ml Ham F-12 培养基冲洗（基本方案 5 第 3 步）。

4b. 一般来说，如果要进行异种移植物气道的功能测定，有必要让异种移植物从病毒感染所引起剧烈毒力中恢复 48～72h。

基本方案 7　体内基因传递到肺部

材料（标√的条目参见附录 1）

cotton rat（8～12g；病毒系统）
异氟烷
纯化的重组腺病毒（单元 12.2）
√PBS
异氟烷
100%最佳切割温度（OCT）培养基（七氟烷）和稀释到 PBS 中的 50%（V/V）OCT 培养基
粉末状干冰/异戊烷填充材料
纱布垫子
50ml 锥形离心管
异丙基乙醇海绵
解剖刀，镊子（2）和小尖剪刀
带 30G 针头的 1ml 注射器
一次性皮肤吻合器 35R（美国氨基氰）
18G AngioCath（Becton Dickinson）和 3ml 注射器
塑料包埋块（Baxter）
恒冷切片机

1. 用异氟烷麻醉一只 80～120g 的 cotton rat，具体做法是用一块异氟烷浸透纱布垫子置于一只 50ml 圆锥形管底部，在把管口放在鼠的鼻子上。通过观察呼吸次数来判断麻醉深度，并且通过调整圆锥形管离鼠鼻子的距离来控制麻醉深度。
2. 用异丙基乙醇海绵清洁鼠的颈部，并且用锋利解剖刀切一条 1cm 长的正中线切口。通过钝式解剖暴露气管，并且通过气管周围的肌肉切一个 3mm 的切口。用一支带 30G 针头的 1ml 注射器慢慢地将总体积为 100～150μl 含 1×10^{10}～5×10^{10} 感染颗粒的 PBS 直接通过气管壁而不要开切口灌输进去，然后补灌 300μl 空气。
3. 用两个 U 形钉缝合切口，然后将动物关进笼内。

对小鼠而言，需要根据动物的总千克重来减少病毒的总剂量和体积。一般而言，一只 25g 重的小鼠耐受 2×10^{9} pfu 的重组病毒，通过 25～35μl 的总体积注入。

在这步操作中讲到的体积将会把病毒传递到气道和肺泡区域。为了提高气管的基因转移而限制肺泡区域的基因传递，可以使用包含相同剂量病毒的更小接种物体积（rat 50μl，mice 15μl）。

4. 通过向腹膜内给药，用过度剂量（200mg/kg）的戊巴比妥使动物安乐死。
5. 打开胸腔暴露近身体中央端的气管。将 18G AngioCath 插到装有 37℃ OCT 培养基和 PBS 混合物（1∶1）的 3ml 注射器上。将 AngioCath 输液管末端插入气管近身体中央端，用三重有节缝线结扎。
6. 轻轻用力推注射器内芯直到肺部在胸腔内膨胀到可见程度（一般 2ml OCT/PBS）。不要使其过度膨胀。移去心脏-肺小盒放到冰预冷的 PBS 中 10min。
7. 从冰预冷的 PBS 中拿出心脏-肺小盒，放在冰预冷的板面上，剪掉非肺组织。
8. 将肺切成大楔形物（约 1cm），放在盛满 100%OCT 包埋培养基的塑料包埋块，使切面贴紧包埋块底部。
9. 用粉末状干冰/异戊烷填充材料冷冻包埋块。在冷冻状态处理组织样本以使其仍然贴紧包埋块底部。
10. 用恒冷切片机切出 6μm 的冰冻切片，并且进行多重组织学分析，如免疫细胞化学、组织化学和原位杂交等。

支持方案 1　收获人类支气管的异种移植物做形态学分析以评价转基因表达

材料（标√的条目参见附录 1）

鼠隐藏异种移植物（基本方案 5 和 6）
√PBS
最佳切割温度（OCT）培养基（Baxter）
粉末状干冰/异戊烷填充材料
解剖工具：小尖剪刀、镊子和剃刀片
塑料包埋块（Baxter）
恒冷切片机

1. 通过 CO_2 窒息对小鼠施无痛致死术取隐藏异种移植物，小心切下异种移植物小盒，放在一块衬有石蜡膜的平坦表面。用两块剃刀片小心地将异种移植气管切成 2mm 圆环通过相对的史托刀片切割边缘。去掉异种移植组织输液管接触的末端。
2. 在 PBS 里漂洗切出的圆环并在不含棉绒纸吸干以去掉内腔多余的黏液。不要用镊子夹紧上皮表面。

   这些组织现在可以直接用来做组化染色或如下面描述的步骤一样新鲜冷冻在 OCT 包埋培养基。

3. 缓慢降低异体嫁接环，将切面向下，装入到一个装满 OCT 的塑料嵌入块中。确定 OCT 能够进入异体嫁接环的腔内，否则冷冻的部分很难切。

4. 用钝的钳状骨针将环推到块的底部。当放置样本时不要进入异体嫁接环的腔内。最多6个环可以植入到一个块中。
5. 将组织块放入粉末状的干冰中或异戊环的黏合剂中，储存在－80℃直到切片。
6. 在恒冷切片机上将组织块切成6μm的冷冻切片。在免疫组化前避免新鲜的切片重复的冻融。一旦切片置于玻片上，应该将其置于恒冷切片机内（－18℃），直到染色，避免风干。或者切片也可以在－80℃下冻存几个星期时间，不会大量丧失β-半乳糖苷酶的活性。

参考文献：Engelhardt and Wilson，1997；Engelhardt *et al.*，1992

编者：Dongsheng Duan，Yulong Zhang，and John F. Engelhardt

单元13.6　基因传递到肝脏

通过一次静脉注射重组的腺病毒（单元12.2），几乎100%的肝细胞被转染。最常用的腺病毒血清型、人5型，能够转染多种种属来源的肝细胞，包括小鼠、大鼠、兔和非人和人灵长类动物。这里给出人5型腺病毒的数量。表13.6.1呈现了基因传递到肝脏的问题解决指导。

注意：所有的实验方案涉及的活体动物应符合NIH和研究机构或大学的指导方针，并且得到动物保护和使用委员会（IUCAC）的批准。

表13.6.1　肝脏中基因转移的疑难解答

问题	可能原因	解决办法
转基因无表达	病毒失去活性	用没有经过多次冻融的病毒；用新准备的病毒；注射前置冰上的时间缩短
注射困难		多练习，尤其用鼠尾端静脉练注射；轮换着多试别的注射点，如鼠颈部静脉
转基因低表达	病毒比预期的活性低	用没有经过多次冻融的病毒；用新准备的病毒；注射前置冰上的时间缩短
	在肝脏内，启动子失活	试另一种启动子，如CMV，或肝特异性的启动子/增强子结合体（如RSV启动子，在肝脏内的工作效率比CMV的低很多）

基本方案1　尾静脉注射传递重组腺病毒到小鼠肝脏

一般来说，在小鼠中优先使用尾静脉注射，因为它既不需要手术，也不要麻醉。其他位点包括颈动脉注射。

材料（标√的条目参见附录1）

成年小鼠，至少6周龄，20～25g

70%乙醇（V/V）喷壶

√重组腺病毒悬液：1×10^{12}个颗粒/ml无菌PBS

带铁丝盖的鼠笼

加热灯

小鼠限制器

棉纱垫

1ml 注射器（27G 针头，1/2in 或者约 1.25cm）

1. 一个鼠笼装 6 只小鼠，加热灯置铁丝盖上方 6～10in（15～25cm）给小鼠取暖。观察小鼠，约 5min 后，它们会在角落里缩做一团，准备注射。不要在角落的位置照射小鼠。
2. 取一只小鼠到限制器中，向其尾部喷 70%乙醇，多余的乙醇用棉花垫拭干。
3. 取一支 1ml 注射器（27G 针头），吸取至少 0.2ml 腺病毒悬液，小心去除针筒中的空气。
4. 抓住尾巴的一端，使其伸展开并略微弯向一侧暴露静脉。以较小的角度插入针头（因为尾静脉相对接近表皮），注射 0.1ml 稀释的腺病毒悬液。静脉会瞬时的膨胀变透亮。如果没有产生胀大的包，停止注射，此时病毒被注射到尾部组织中而不是静脉中。
5. 抽出针头，迅速用手指压住出血点，直到出血停止。将小鼠放回原来的笼子。

基本方案 2　重组腺病毒通过耳外静脉注射到兔的肝脏

材料（标√的条目参见附录 1）

成年兔，约 2kg

70%乙醇（*V/V*），可选

√重组腺病毒悬液：3ml 无菌 PBS（含 0.75×10^{13}～1.0×10^{13} 个颗粒）

兔的限制笼

棉纱垫

5ml 注射器（21G 针头）

凡士林

1. 将成年实验兔放置于固定盒内。用浸取了温水的纱布反复擦拭使其耳内血管膨胀。也可使用 70%的乙醇。注意其静脉血管位于耳朵外缘，动脉游走于中心。
2. 在 5ml 注射器上装上 21G 蝶形针头，然后吸入 3ml 腺病毒悬液，排除注射器内的空气。注射器内含有一定量的空气可使所有的溶液被注射入内。
3. 扎入蝶形针头至兔耳静脉，并沿血管行进足够的深度以方便固定针头。开始以1ml/min 的速率注射腺病毒。在蝶形针头内留滞少量的溶液，注意一定不能注射入任何空气。
4. 移出针头，然后迅速用纱布垫子压住扎口止血。
5. 用凉水轻柔的清洗兔耳。并在兔耳上涂抹少量凡士林。观察兔子 10～15min，如果兔看起来要昏睡，抚摸它保持其清醒。并立起或移动固定盒。

支持方案　收获肝组织以分析转基因表达

如果转基因编码的蛋白分泌至循环系统，那么其表达可经抽取动物血液并通过对血浆中的蛋白进行免疫杂交（如 CPMB 单元 10.8）或酶学试验（如 CPMB 单元 11.2）来

验证。对于胞内或膜蛋白，肝组织收获后，转基因表达常应用免疫组化或免疫荧光（如 CPMB 第 14 章）、酶学试验（通常用冰冻切片或石蜡切片）、免疫杂交进行分析。可采用多重时间点来监控转基因表达的水平和持续时间。

材料

注射重组载体的鼠或兔（基本方案 1 或 2）
70%（V/V）乙醇
OCT（最佳切割温度）复合物
2-甲基丁醇
解剖器
镊子和手术刀
灭菌塑胶盘
刀片
塑料模具
低温恒温器
干冰
冻存管
液氮

1. 注射腺病毒后，改善环境以侍养实验鼠或兔 3～5d。用绳带将动物的脚固定至解剖器上，使其腹部朝上，并保持其四肢伸展。
2. 用 70%的乙醇润湿动物腹部的毛发。用镊子夹起其腹部的皮肤并沿中线切割，将其皮肤与腹壁分离。使用镊子提起其腹壁，继续沿中线切割，注意不要损伤其内脏。再在剖面的侧位进行一些切割，然后将其皮肤和腹壁翻折过来。
3. 小心的切除肝脏，避免用镊子夹住肝脏组织。将其放置于灭菌的塑胶盘上。用两片干净的刀片将肝组织切碎。保持一把刀片与切割方向一致，然后拖动另一刀片来切割其邻近组织。
4. 将肝组织样品按以下一种或多种方法进行保存。
   a. 石蜡切片。将切割的组织碎片（几毫米）置入福尔马林缓冲液中。包埋前固定过夜或更久。
   b. 新鲜冰冻切片。切碎的组织放入塑料模具中（对于小鼠肝脏，22mm×22mm 大小的模具即可容纳一片大的或两片小的肝组织），然后用 OCT 复合物进行覆盖。在通风橱中放置一个较浅的容器，装入约 1in（约 2.5cm）的 2-甲基丁醇以及干冰球或磨碎干冰。当其冷却后，将塑料模具放入容器中，使得 2-甲基丁醇的冷却程度与 OCT 的相当。当完全冰冻后，将样品保存于－70℃。在低温恒温器中切割前先预冷至 －20℃。
   c. RNA 纯化（Northern blot）或蛋白制样（immunoblots）。应从一些不同的肝叶中切取组织，并放入标记好的冻存管内。投入液氮中，并保存至－70℃。

参考文献：Ferry and Heard，1998；Hitt *et al.*，1997

编者：Karen Kozarsky

附录1 试剂与溶液

本附录收录了《人类遗传学简易手册》所涉及的所有试剂和溶液配方。溶液名称按英文字母顺序排列，溶液所在的单元在括号内列出来。这些单元的出处很重要，常用的溶液未对其单元号进行标注，因为某些溶液在不同单元中虽然名称相同，但配方却不同。某些溶液（如PBS）在某一或某些单元中有共同的配方。一些溶液的配方中所包含的某些试剂的配制在该附录中用“参照配方”或“√”标出。酸和碱的摩尔浓度及比重等一般信息在表A.1.1中列出。使用去离子水、蒸馏水来配制溶液，（多数情况下）尽可能使用最高级别纯度的试剂来配制溶液。在大多数情况下，推荐对所配制的溶液进行灭菌，一般用高压灭菌或过滤除菌。

表A.1.1 浓酸、浓碱的摩尔浓度和比重

酸/碱	分子质量	质量分数/%	摩尔浓度（约）	1mol/L溶液/（ml/L）	比重
酸					
冰乙酸	60.05	99.6	17.4	57.5	1.05
甲酸	46.03	90	23.6	42.4	1.205
		98	25.9	38.5	1.22
盐酸	36.46	36	11.6	85.9	1.18
硝酸	63.01	70	15.7	63.7	1.42
过氯酸	100.46	60	9.2	108.8	1.54
		72	12.2	82.1	1.70
磷酸	98.00	85	14.7	67.8	1.70
硫酸	98.07	98	18.3	54.5	1.835
碱					
氨水	35.0	28	14.8	67.6	0.90
氢氧化钾	56.11	45	11.6	82.2	1.447
		50	13.4	74.6	1.51
氢氧化钠	40.0	50	19.1	52.4	1.53

注意：当操作危险化学试剂时，必须遵守实验室安全操作规程，并注意生产厂家对危险试剂的预防措施。

丙酮/甲醛固定剂（单元4.7）

准备甲醛含量为0.007%～0.03%（V/V）的丙酮（50ml丙酮中加入10～40μl 37%的甲醛）。调整优化甲醛的浓度，使用较高浓度的甲醛来更好的显示细胞核以及染色体的形态，使用较低浓度的甲醛来提高免疫染色的效果。初始的最佳浓度为0.015%。

酸沉淀溶液（附录 3E）

1mol/L HCl
0.1mol/L 焦磷酸钠
不需室温储存

Tyrode 酸（单元 9.9）

800mg NaCl（137mmol/L 终浓度）
20mg KCl（2.7mmol/L 终浓度）
400mg 聚乙烯吡咯烷酮（PVP；平均分子质量约 40000；终浓度 0.1μmol/L）
20mg $CaCl_2 \cdot 2H_2O$（1.36mmol/L 终浓度）
10mg $MgCl_2 \cdot 6H_2O$（0.49mmol/L 终浓度）
5mg $NaH_2PO_4 \cdot 6H_2O$（或 4mg Na_2HPO_4；0.36mmol/L 终浓度）
100mg 葡萄糖（5.5mmol/L 终浓度）
加水至 100ml
用稀盐酸调节 pH 至 2.3（可接受的 pH 为 2.2～2.4）
用 0.22μm 的无菌过滤器过滤，弃去开始滤过的一小部分液体
4℃储存 1 个月
为确保溶液的有效性，应利用条带打孔来检测溶液（如在透明带中孔的逐步溶解）。

丙烯酰胺/双丙烯酰胺混合液，37.5∶1（30%）（单元 9.10）

30%（*m/V*）丙烯酰胺
0.8%（*m/V*）双丙烯酰胺
加水至 500ml
过滤
4℃避光保存
注意：丙烯酰胺具有神经毒性，在接触丙烯酰胺、配制溶液或倒胶时必须戴手套。聚合后的丙烯酰胺无毒。

丙烯酰胺储存液，50%（*m/V*）（单元 7.2）

49g 丙烯酰胺
1g 双丙烯酰胺
加水至 100ml
4℃保存 30d
注意：丙烯酰胺具有神经毒性，在接触丙烯酰胺、配制溶液或倒胶时必须戴手套。聚合后的丙烯酰胺无毒。

AHC 培养基与培养板（单元 5.1）

1.7g 不含氨基酸与硫酸铵的含氮碱基（Difco）

5g 硫酸铵
10g 酪蛋白水解酸（不含盐与维生素；美国 Biochemical 公司）
20mg 硫酸腺嘌呤（Sigma）
溶于 950ml 水中
用 5mol/L HCl（约 150μl）调节 pH 至 5.8
加入 18g 琼脂（如果准备培养板）
高压灭菌 20min
加入 50ml 无菌的 40%（m/V）葡萄糖
将液体培养基保存于 4℃
对于培养板，每 150mm 培养板倒入 80～100ml 培养基，保存于 4℃

碱性缓冲液（单元 4.5）

1mmol/L 硼酸钠，用 NaOH 调 pH 至 10～11
0.8%（m/V）KCl
在使用前按 1∶1 比例混合
可根据经验将工作液的 KCl 浓度和 pH 调节至最佳。

碱性磷酸酶缓冲液，pH9.5（单元 4.4）

√0.1mol/L Tris·Cl，pH9.5
0.1mol/L NaCl
50mmol/L $MgCl_2$（在使用前即时加入）
未添加 $MgCl_2$ 的情况下室温储存≤1 年

碱性磷酸酶结合的寡核苷酸 $(CTG)_{10}$（单元 9.4）

使用商业试剂盒（如 Cambridge Research 公司生产的 E-Link Plus 寡核苷酸标记试剂盒）将 CTG_{10} 寡核苷酸结合到碱性磷酸酶，并用分光光度计说明书上有关酶检测的方法来检测寡核苷酸的有效性。将已结合的寡核苷酸分装到独立使用的管内（如 20μl/管）以避免反复冻融。−20℃下储存期限≤1 年

碱性磷酸酶染色缓冲液（单元 12.4）

100mmol/L NaCl
√50mmol/L $MgCl_2$
√100mmol/L Tris·Cl，pH8.5
室温储存于用锡箔纸包裹的玻璃容器内

碱性磷酸酶染色液（单元 12.4）

在碱性磷酸酶染色缓冲液（详见相应配置方法）中加入 1×NBT 溶液（详见相应配置方法）和 1×BCIP 溶液（详见相应配置方法）。使用前即时配置。

乙酸铵，10mol/L

将385.4g乙酸铵溶解于150ml水中
加入水至500ml
过滤除菌

硫酸铵，饱和，pH7.0（单元12.3）

将450g硫酸铵加入500ml水中，置于一个加热的搅拌盘中直至完全溶解。在溶液仍然温暖时滤过Whatman滤纸，允许溶液冷却（一旦冷却，会形成结晶，但不要除去这些结晶）。用氢氧化铵调节pH至7.0。4℃可保存一年

扩增缓冲液，10×（单元1.3和单元9.9）

√100mmol/L Tris·Cl，pH8.3
500mmol/L KCl（但无钾的缓冲液除外）
25mmol/L $MgCl_2$
0.1%（m/V）明胶
高压灭菌后分装储存于1.5ml的管中（以减少污染）室温下储存不超过3个月
当在精液裂解和中和液中有KOH与KCl提供钾离子时，缓冲液可以不添加钾离子。

麻醉溶液（单元13.2）

将2ml氯胺酮（100mg/ml ketamine·HCl；Fort Dodge动物健康处）与1ml 20mg/ml甲苯噻嗪（甲苯噻嗪；Bayer有限公司，农业处）混合于27ml无菌PBS作为接种液（详见有关配方）。4℃贮藏，时间不超过1周

麻醉溶液（单元13.3）

7.5ml 10mg/ml氯胺酮（Fort Dodge实验室）
0.75ml 100mg/ml马来酸乙酰丙嗪（Fermenta动物健康处）
1.9ml 20mg/ml甲苯噻嗪（甲苯噻嗪；Bayer有限公司，农业处）
加入0.9%NaCl至20ml
在注射前新鲜配制

防脱色封固剂（单元4.4、4.7、4.8和8.6）

DABCO封固剂：将0.233g 1,4-重氮基-[2.2.2]双环辛烷（Sigma公司；终浓度0.21mol/L）溶解于800μl水中，加入200μl 1mol/L Tris·Cl，pH8.0（详见相应配制方法；终浓度0.02mol/L）加入9ml甘油（终浓度90%）。混匀。分装于锡箔纸包裹的100μl小管中，储存于−20℃。融化后仅使用一次

苯二胺氟安定：将50mg p-苯二胺氟安定溶于5ml PBS中（终浓度9mmol/L）。用0.5mol/L的碳酸氢盐缓冲液或pH9.0的缓冲液（详见相应配方）将pH调节到8。将

配制好的苯二胺氟安定加到 45ml 的丙三醇中（终浓度为 90%），混匀，使用 0.22μm 的滤器过滤。分装于小管中避光保存于−20℃中。解冻后只能使用一次。

Vectashield：购买于 Vector 实验室；按指导手册使用。

APAAP 底物溶液（单元 4.7）

萘酚 AS-MX 磷酸钠溶液：

0.002g 萘酚 AS-MX 磷酸钠（无酸；终浓度为 0.03mol/L）

200μl *N*，*N*-二甲基酰胺

储存于玻璃管中，4℃中储存时间不超过 2 个月

盐酸左旋咪唑溶液：

0.0024g 盐酸左旋咪唑（Sigma；终浓度 9.9mmol/L）

√1.0ml Tris/乙酸酶底物缓冲液，pH8.2

新鲜配制

坚固红溶液：

0.0100g 坚固红

√1.0ml Tris/乙酸酶底物缓冲液，pH8.2

新鲜配制

工作液：

√780μl Tris/乙酸酶底物缓冲液，pH8.2

20μl 萘酚 AS-MX 磷酸钠溶液

100μl 盐酸左旋咪唑溶液

100μl 坚固红溶液

按照以上次序依次加液混匀。通过 0.45μm 过滤器直接过滤到片子上。在 20℃混匀后立刻使用。

细菌用胰蛋白酶溶液（单元 4.3）

在细菌用胰蛋白酶专用管形瓶中将重组细菌用胰蛋白酶粉（Difco）加入 10ml 水中。以每管 0.4ml 进行分装，在−20℃下冻存不超过 6 个月。使用时，将 0.3ml 储存液与 70ml Sorensen 磷酸盐缓冲液混匀于 Coplin 瓶中，pH6.8（详见有关配方），为了提高胰酶浓度，可将储存量提高到 1.5ml。每日新鲜配制。

BBMM（基本骨髓培养基）（单元 13.4）

√375ml 1×IMDM

√100ml FBS，56℃中热失活 1h

√25ml 去离子水配制的 10%（*m*/*V*）BSA

5ml 200mmol/L L-谷氨酰胺

2.5ml 10 000U/ml 青霉素/10 000μg/ml 链霉素（Life Technologies）

√500μl 0.1mol/L 2-ME

√500μl 1mmol/L 氢化可的松

4℃储存1个月

FBS与BSA中的块状物必须滤掉（支持方案5）

BCIP溶液，100×（单元12.4）

将5-溴-4-氯-3-indoyl磷酸（BCIP）溶于水中，浓度为10mg/ml。储存于锡箔纸包装的玻璃容器中（如避光保存），于20℃中储存（可稳定储存数月）。

BEGM（支气管上皮细胞生长培养基）（单元13.5）

添加以下的BEGM SingleQuok试剂盒（Clonetics）BEGM的成分到500ml BEBM（支气管上皮基础培养基，也来自Clonetics）：

2ml 13mg/ml的牛脑垂体提取物（BPE，终浓度为0.052mg/ml）

0.5ml 0.5mg/ml氢化可的松（终浓度为0.0005mg/ml）

0.5ml 0.5μg/ml人重组上皮生长因子（hEGF；终浓度为0.0005μg/ml）

0.5ml 0.5mg/ml肾上腺素（终浓度为0.0005mg/ml）

0.5ml 10mg/ml转铁蛋白（终浓度为0.01mg/ml）

0.5ml 5mg/ml胰岛素（终浓度为0.005mg/ml）

0.5ml 0.1μg/ml维甲酸（终浓为度0.0001μg/ml）

0.5ml 6.5μg/ml三碘甲腺原氨酸（终浓度为0.0065μg/ml）

Clonetics厂家的BPE有时质量有一些改变，因此必须要对BPE不同批号的产品进行预筛选，以提供最佳生长能力。

Bio948，500pmol/L（单元11.1）

√含DEPE的处理水

500pmol/L生物素化的寡核苷酸Bio948（5′-GTCAAGATGCTACCGTTCAG-3′）

√1×MES缓冲液

0.1mg/ml鲱鱼精子DNA（Promega）

0.5mg/ml BSA（Life Technologies）

−20℃储存1年

Bio-Gel P-60（单元4.5）

将2g Bio-Gel P-60（Bio-Rad）加到300ml H_2O中。使胶珠完全悬浮并高压灭菌。室温储存不超过6个月。

生物素检测溶液（单元4.4）

用4×SSC（见相关配方）/1%（*m*/*V*）BSA（Ⅴ级）将荧光素——卵白素DCS或罗丹明D（Vector实验室）稀释到2μg/ml。每日新鲜配制。

生物素/异羟基洋地黄毒苷元检测溶液（单元4.4）

分别用4×SSC（见配方）/1%(*m*/*V*)BSA(Ⅴ)级荧光素——卵白素DCS（Vector

实验室）和罗丹明结合的羊抗异羟基洋地黄毒甙元抗体的 Fab 段（Boehringer Mannheim 公司）稀释到 2μg/ml，每天新鲜配制。

生物素标记的碱磷酸酶溶液（单元 4.4）

√PBS 包含：

1%（*m*/*V*）BSA

0.1%（*V*/*V*）Tween 20

2.5μg/ml 生物素碱性磷酸酶

新鲜配制

生物素标记的抗卵白素抗体（单元 8.6）

将 0.5mg 生物素标记的抗卵白素 D（Vector 实验室）加入 1ml 无菌水中并分装到 110μl 的小管中储存于－20℃中。在使用前，将 100μl 500μg/ml 的储存液稀释到 9.9ml 的 PNM 缓冲液（详见相关配方）中。新鲜配制（终浓度 5μg/ml）。

生物素标记的辣根过氧物酶溶液（单元 4.4）

√PBS 包含：

1%（*m*/*V*）BSA

0.1%（*V*/*V*）Tween 20

3μg/ml 新鲜的生物素标记的辣根过氧物酶

封闭液（单元 2.1）

在检测缓冲液（详见有关配方）中准备 1%（*m*/*V*）的用于核酸杂交的封闭液 (Boehringer Mannheim)，稍微加热并搅拌约 15min。使用前新鲜配制。

印迹缓冲液（单元 9.10）

25mmol/L Tris，超纯（ICN Biiochemicals）

190mmol/L 甘氨酸

20%（*V*/*V*）甲醇

在使用前准备 1L 新鲜溶液，并至少在冰上预冷 1h

牛血清白蛋白，见 BSA

Brdu 储存液，2mmol/L（单元 8.4）

将 6.142mg 5-溴-2′-脱氧尿嘧啶核苷（如 Aldrich 或 Sigma 公司）溶解于 10ml 水中。用 0.22μm 的过滤器无菌过滤。在无菌小玻璃瓶中分装，1ml/管避光保存，粉剂在－20℃下避光干燥状态下，至少可以储存 2 年。

BSA（牛血清白蛋白），10%（*m*/*V*）

将 10g Ⅴ级 BSA（如 Sigma）溶于 100ml 水中，使用低蛋白结合力的 0.22μm 的过

滤器过滤，储存于4℃。

不同的BSA可能有不同的来源、制备、纯度、pH与价格，因为BSA的形式是变化的，所以它们有不同的用途，根据需要选择适合的BSA来应用。

BSA，10%（*m/V*），去离子（单元13.4）

小心将100g SigmaⅤ级BSA倒入440ml无菌水中，在4℃下不搅拌静置24～36h，直至完全溶解。加入15g树脂珠（AG501-X8 [D]；Bio-Rad）。在冷室内慢慢搅拌，直至所有的珠均改变颜色为止（通常需要数小时）。另外加入15g树脂珠，在冷室内搅拌过夜。如果还没有出现蓝色的珠，可重复加入树脂珠，并保存到第2天早上。用带有纱布的漏斗将BSA过滤到一个充分清洗（无肥皂残留）的量筒与容量瓶内。加入等量体积的2×IMDM（见相关配方）。用Whatman滤纸通过漏斗过滤溶液，检测溶液pH以确保pH接近7.0；如果偏离7.0，则加入7.5%(*m/V*)碳酸氢钠溶液（组织培养级；Sigma）以增加pH。先后使用0.8μm和0.2μm的一次性过滤器（Nalge）过滤除菌，塑料管中以每管25ml分装保存，−20℃下储存1年。

石碳酸缓冲液，见苯酚

$CaCl_2$，0.5mol/L（单元12.6）

36.7g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
加入H_2O至500ml
通过0.45μm硝酸纤维素滤膜无菌过滤
用50ml管中分装，4℃下储存2个月

$CaCl_2$，2mol/L（单元12.4、单元12.5、单元12.7）

29.41g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
加入H_2O至100ml
通过0.2μm硝酸纤维素滤膜无菌过滤
4℃下储存1年

$CaCl_2$，2.5mol/L（单元12.3）

183.7g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$（Sigma；组织培养级别）
加入H_2O至100ml
通过0.45μm硝酸纤维素滤膜无菌过滤（Nalgene）
用10ml管中分装，−20℃下储存，可反复冻融

小牛胸腺DNA标准溶液（附录3D）

试剂盒含有用于荧光测定法的小牛胸腺DNA标准（荧光参考标准试剂盒；Hoefer）。另外，Sigma公司也有经CsCl梯度离心了已知GC含量的标准品可以用于吸收和光谱学分析（例如，小牛胸腺DNA，GC含量为42%；梭状芽孢杆菌产气荚膜梭

菌素 DNA，GC 含量 26.5%）。

小牛胸腺 DNA 标准溶液（单元 10.4）

使用 1mg/ml 的小牛胸腺 DNA 储存液来准备以下的标准品。4℃下密封保存不超过 6 个月。

10μg/ml：将 10μl 储存液与 100μl 10×TNE 缓冲液（见有关配方）以及 890μl 无菌水混合均匀。

100μg/ml：将 10μl 储存液与 10μl 10×TNE 缓冲液（见有关配方）以及 80μl 无菌水混合均匀。

250μg/ml：将 25μl 储存液与 10μl 10×TNE 缓冲液（见有关配方）以及 65μl 无菌水混合均匀。

500μg/ml：将 50μl 储存液与 10μl 10×TNE 缓冲液（见有关配方）以及 40μl 无菌水混合均匀。

毛细管测定溶液（单元 10.4）

√100μl 10×TNE 缓冲液
20μl 1mg/ml 烟酸己可碱 33258 染液储存液
800μl H_2O
使用前即时准备（当荧光计预热后）

羧苄西林，100mg/ml（单元 11.2）

1g 羧苄西林（Life Technologies）
10ml 无菌水
用 0.2μm 过滤器过滤
－20℃下储存不超过 2 个月

碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液，pH9.0，0.5mol/L（单元 4.4）

0.42g $NaHCO_3$
10ml H_2O
用 NaOH 调节 pH 至 9
室温下储存时间不超过 1 年

细胞裂解缓冲液（单元 5.1）

√1L 0.5mol/L EDTA，pH8.0
10g *N*-lauroyl 肌氨酸钠（肌氨酰；终浓度 1%）
25μg/ml 蛋白水解酶 K（用前加入）
25℃储存

细胞裂解溶液（单元 1.3）

9 份 222mmol/L 刚高压灭菌过的 KOH

√1份500mmol/L DTT

用前准备

细胞休克溶液（单元9.6）

8.0g/L NH_4Cl（149mmol/L）

1.0g/L EDTA（2.6mmol/L）

0.1g/L KH_2PO_4（0.7mmol/L）

用NaOH调节pH至7.0

高压灭菌

室温内储存不超过1年（如果无菌状态可以维持的话）

细胞染色溶液（单元12.4）

1g/L考马斯亮蓝G

40%（V/V）乙醇

10%（V/V）乙酸

50%（V/V）H_2O

室温储存

Chang培养基，20%（单元8.2）

80ml α-MEM（Irvine Scientific或Life Technologies）

20ml FBS（56℃热失活1h；Irvine Scientific或WhittakerBioproducts）

2.5ml Chang A（Irvine Scientific）

22ml Chang B培养基（Irvine Scientific）

1ml 200mmol/L L-谷氨酰胺（Life Technologies）

1ml青霉素/链霉素储存液（Life Technologies；5000U/ml每个储存浓度）

从装盛100ml α-MEM的瓶子中移出20ml液体，然后加入其他成分到剩下的80ml培养基中。每周在无菌条件下新鲜配制并储存在4℃。对于新近配制的溶液要进行无菌检测，将3ml的培养液取出置于无菌管中，在37℃，含5%CO_2的增湿培养箱中过夜培养。在培养24h后，培养基应该仍然保持澄清状。

应该检测的成分：对于新配置的Chang培养基，均要通过培养经羊膜穿刺术取得的羊水，来检测它们的培养能力，每次取羊水样品的一半在100% Chang培养基中培养（见相关配方）来进行检测（取样在妊娠14～22周进行）。对于新批次的青霉素/链霉素、L-谷氨酰胺、FBS、α-MEM均要分别检测，检测时将它们分别加入20%的Chang培养基中，每次检测实验中仅用一半的羊水样品。

羊水样品在含有新批次试剂的培养基中的生长情况不应该与含有旧批次试剂的培养基培养的情况有差别。羊水在100% Chang培养基中的生长速度应该比在含20% Chang培养基中的生长速度快2～3d。而染色体断裂的现象在100% Chang培养基中会显著增加。

Chang 培养基，100%（单元 8.2 和单元 8.7）

1 瓶 Chang B 培养基（Irvine Scientific）
1 瓶 Chang A 补充成分（Irvine Scientific）
1ml 青霉素/链霉素（Life Technologies；5000U/ml）
1ml 200mmol/L L-谷氨酰胺（Life Technologies）

Chelex 100 黏结剂（附录 3C）

用高压灭菌的去离子水中准备 1∶1（*m*/*V*）的 Chelex 100（50～100 筛孔，Bio-Rad）的混合剂。室温中储存 3 个月。在配剂前应摇晃混合剂以产生一个一致的悬液。

胆固醇储存液，20.0mg/ml（51.7mmol/L）（单元 12.9）

用氯仿冲洗玻璃检测管 3 次并于空气中晾干。称重 100.0mg 的胆固醇到管子中。用约 4.0ml 的氯仿溶解胆固醇，然后用更多的氯仿来稀释到 5.0ml。封盖避光，在 −20℃下储存 3 个月。

Church 杂交缓冲液（单元 5.2）

500ml 1.0mol/L 的磷酸缓钠冲液，pH7.2（终浓度为 500mmol/L）
√350ml 20%（*m*/*V*）的 SDS（终浓度为 7%）
√100ml 10%（*m*/*V*）BSA（终浓度为 1%）
√2ml 0.5mol/L EDTA，pH7.6（终浓度为 1mmol/L）
48ml H_2O

对于 1.0mol/L 的磷酸钠缓冲液来说：添加 268.08g 的 $NaH_2PO_4 \cdot 7H_2O$ 到 800ml 水中，如果必需的话可加温溶解，用浓缩磷酸（约 4ml）。将终容积调节到 1L。室温中储存。

杂交缓冲液：加入 SDS、BSA、EDTA 和水。室温中储存 3 个月。

洗涤液（单元 11.2）

将 100g NaOH 溶解在 400ml 水中。加入 600ml 100%的乙醇并搅动，直至溶液变清为止，如果溶液还是不变清，可加入水直至它变清为止。室温下储存 24h。

Cloning 量筒（单元 3.1）

可购买玻璃或金属的 Cloning 量筒（如 BellcoGlass），这些量筒应该一用蒸馏水清洗完全。并应该放置于一个玻璃的培养板中高压灭菌，或储存在 95%的无水乙醇中，在使用前立即通过火焰烧灼。在使用后，量筒应该用 10mol/L 的 KOH（以除去真空油酯）清洗，并可重新使用。可在室温中储存。

此外，也可丢弃使用过的量筒，取 200μl 的 Tip 头，用小刀在距离 Tip 头宽边 1cm 处切割，高压灭菌后便可作为新的量筒来使用。

冰冻核苷酸混合液，10×（单元2.1）

√dGTP、dATP和dTTP各2mmol/L（见dNTP配方）
√25μmol/L dCTP（见dNTP配方）
−80℃下储存6个月

胶原，0.3%（单元13.3）

将10mg大鼠尾胶原（Sigma）溶于3.3ml 0.1%乙酸中（15μl冰乙酸溶于14.985ml经高压灭菌的双蒸水中；并通过0.22μm的过滤器过滤）。旋涡振荡溶液3～5次，并在室温下振荡过夜，以促使胶原完全溶解。新鲜配制。

新近配制对于保持胶原质量很重要，不要使用配制超过2周的胶原。

胶原包被的组织培养板（单元13.2）

将1ml浓乙酸到179ml水中，并用0.2μm的过滤器无菌过滤。将20ml 0.1%的无菌小牛皮肤胶原（Sigma）加入到0.1mol/L的乙酸中。并将以上液体加入到塑料组织培养板中，并在室温下培养过夜（并不是在一个细胞培养箱）。从板中除去胶原溶液（溶液可被重新使用；4℃中储存）。用无菌水完全清洗培养板并晾干。室温中储存（至少可稳定6个月）。

胶原酶，10mg/ml（单元10.2）

将冻干的胶原溶解在无菌的无添加物的RPMI1640中，并配制10mg/ml的储存溶液。加入0.05%（*m/V*）的Ⅰ型DNase，并通过0.45μm的过滤器。分装成0.5～1ml每管保存，在−20℃下储存不超过6个月。不要反复冻融。

Boehringer Mannheim与Life Technologies公司的B类胶原酶均有很好的使用效果。

胶原酶/中性蛋白酶/$CaCl_2$溶液（单元13.2）

1.5U/ml胶原酶D（Roche Molecular Biochemicals）
2.4U/ml中性蛋白酶，Ⅱ级（Roche Molecular Biochemicals）
2.5mmol/L $CaCl_2$

配制2×胶原酶和中性蛋白酶储存液，在使用前用储存液新鲜配制（储存液分装储存在−20℃中）。

胶原酶溶液（单元8.1）

将胶原酶Ⅳ粉（Worthington）溶于Eagle's MEM，将浓度配制为100U/ml（但配制浓度应基于供应商所提供的酶活性）。无菌过滤，分装到5ml瓶中，−20℃中保存2个月。

胶原酶溶液（单元 8.3）

将胶原酶 CLSI（Worthington）或胶原酶Ⅱ或Ⅳ溶解到无血清的培养基中或溶于 HBSS（见有关配方）中，浓度为 3mg/ml。无菌过滤，1ml 分装保存于－5℃中。

胶原酶溶液（单元 10.1）

重悬 100mg DNase（Sigma）于 10ml HBSS（见有关配方）。5ml 分装保存于－20℃。将 1 份分装的 DNase 加入到 95ml 的 RPMI 1640 液中。加入瓶装的 1g BMR B 类胶原酶（Roche Diagnostics）。盖好盖子并摇动混匀以充分溶解。对于瓶中残余的胶原酶应该充分清洗下来。用 0.45μm 的无菌过滤器（Fisher；可能需要使用 3 或 4 个过滤器）过滤溶液。分装为 1ml，－20℃储存不超过 6 个月，需要时融化。

比色计底物（单元 2.2）

将 5mg 片剂磷酸酶底物（Sigma，－20℃储存 6 个月）溶解于二乙醇胺缓冲液（见有关配方）中。使用前新鲜配制。

完全培养基 A（单元 10.1）

在一个 100ml 无菌瓶子中添加以下成分：

100ml 含 HEPES（Life Technologies）的 RPMI1640

√20ml 加热灭活的 FBS

6.2ml 三甲氧唑辛 GCT-CM（Igen International，Fisher）

1ml 谷氨酰胺（Life Technologies；完全溶解）

1ml 青霉素/链霉素/新霉素（PSN）抗生素混合液（Life Technologies）

－20℃储存 6 个月，需要时融化。

完全培养基 B（单元 10.1）

配制同完全培养基 A，但不加 GCT-CM。

完全培养基 DMEM

Dulbecco 改良 Eagle 培养基，高糖含量（如 Life Technologies），含：

√热灭活的 FBS（按所需 FBS 终浓度加入）

1%（V/V）非必需氨基酸

√2mmol/L L-谷氨酰胺

100U/ml 青霉素

100μg/ml 硫酸链霉素

无菌过滤，4℃储存 1 个月

含 10%FBS 的 IMDM 完全培养基（单元 12.3）

Iscove 改良的 Dulbecco 培养基（Life Technologies），含：

√10% (*V/V*) FBS
100U /ml 青霉素
100μg/ml 硫酸链霉素
过滤，4℃储存 1 个月

完全培养基 MEM（单元 12.7）

Eagle 改良的必需培养基（MEM）含：
1×非必需氨基酸
100U/ml 青霉素 G
100μg/ml 硫酸链霉素
2mmol/L 谷氨酰胺
10%（*V/V*）FBS（仅在需含 FBS 的培养基中加入）
用 0.2μm 的无菌过滤器（Nalgene）过滤
4℃储存 1～2 个月
以上所有成分均可从 Life Technologies 购买到。
无血清的 MEM 完全培养基用于病毒吸附和准备甲基纤维素覆盖（见配方）。

完全培养基 RPMI

RPMI1640 培养基（如 Life Technologies）含：
√预期浓度的 FBS（经热失活）
√2mmol/L L-谷氨酰胺
100U/ml 青霉素
100μg/ml 硫酸链霉素
无菌过滤 4℃储存 1 个月

完全培养基 RPMI（单元 4.2）

含 300mg/L 的 L-谷氨酰胺和 25mmol/L HEPES 的 RPMI1640 培养基（如 Life Technologies）
1%（*V/V*）10mg/ml 庆大霉素溶液（Sigma；终浓度为 100μg/ml）
4℃瓶中储存至厂家标注失效的日期

对照引物（单元 9.7）

通常，使用对照引物 A 和 B。在 ARMS 产物超过 300bp 的时候使用引物 C 和 D。当 ARMS 产物有高 GC 含量时（>65%）且长度超过 300bp 时选择对照引物 E 和 F。
对照引物 A
5′-CCCACCTTCCCCTCTCTCCAGGCAAATGGG-3′
对照引物 B
5′-GGGCCTCAGTCCCAACATGGCTAAGAGGTG -3′
这些引物扩增 ATT 基因的一个片段并产生一个 360bp 大小的产物。

对照引物 C

5′-CCAAGCCCAACCTTAAGAAGAAAATTGGAG-3′

对照引物 D

5′-CCAAACCCACGGTACGCATGGGAACACTGC-3′

这些引物扩增 APC 基因的一个片段并产生一个 813bp 大小的 APC 基因的 PCR 产物。

对照引物 E

5′-CTCACCTGCGTCAGGAGAGCACACACTTGC-3′

对照引物 F

5′-CATCGAGACCTCGGCCAAGACCCGGCAGG-3′

这些引物扩增 RAS 基因的一个片段并产生一个 825bp 大小的 RAS 基因的 PCR 产物。

结晶紫染色溶液，1%（*m*/*V*）（单元 12.7）

1g 结晶紫（Sigma）

100ml 50∶50（*V*/*V*）甲醇/H_2O

室温可储存 1～2 年

氯化铯梯度溶液（单元 12.3）

50g CsCl（密度为 1.37g/ml 时）或 60g CsCl（密度为 1.5g/ml 时）

√加入 PBS 至 100ml

通过称重 1ml 溶液来检测每个溶液的密度。无菌过滤。室温下储存 1 年。

CSPD，0.2mmol/L（单元 2.1）

准备 25mmol/L 的 disodium 3-（4-methoxyspiro {1，2-dioxetane-3，2′-（5′-chloro）tricycle [3.3.1.$1^{3,7}$] decan} -4-yl）phenyl phosphate（CSPD；Tropix）储存液，4℃或－20℃储存。在使用前，即时稀释 80μl 到 10ml 底物缓冲液中（见有关配方）。

培养与显微操作培养基（单元 9.9）

胚胎培养基与清洗培养基：准备以碳酸氢盐作为缓冲系统的人输卵管液（HTF）培养基（Irvine Scientific），或其他适合的以碳酸氢盐作为缓冲系统的 IVF 培养基，并添加以下蛋白质中的一种：10%合成血清替代物（Irvine Scientific），10%的 5%人血清白蛋白溶液（Irvine Scientific）或 10%母亲的血清。一旦添加蛋白质后于 4℃可储存 1 周，4℃储存的未开启的培养基应该在生产日期后的 50 天内用完。

活检培养基：准备 HEPES 为缓冲体系的 HTF 培养基或其他适合的以 HEPES 为缓冲体系并添加了如上述的蛋白质成分的培养基。4℃下储存 1 周。

卵裂细胞冲洗培养基：准备 HEPES 为缓冲体系的 HTF 培养基或其他适合的以 HEPES 为缓冲体系的未添加蛋白质的培养基（或加入上述已纯化的蛋白质成分，无 DNA 污染，或不干扰 DNA 扩增和分析。4℃下储存 1 周。

用 0.22μm 的无菌过滤器过滤，并丢弃开始过滤的一小部分的滤液。

透明带穿洞技术在 HEPES 缓冲液中比在碳酸盐缓冲液中更慢但更精细。在活检过程中，HEPES 缓冲液可提供更方便的空气平衡和更好的 pH 稳定。所选择的蛋白质成分能支持胚胎的进一步发育并在进行分子分析的时候应该无 DNA 污染。

使用的 Milli-A 的纯化水（符合美国病理学会的Ⅰ类试剂的水标准）或在所有试剂中使用其他的用于胚胎培养的检测过的超纯水。

循环测序反应缓冲液，10×（单元 7.5）

√100mmol/L Tris·Cl，pH9.0
500mmol/L KCl
40mmol/L $MgCl_2$
dATP、dCTP、dGTP（或 7-deaza-dGTP）和 dTTP 各 20μmol/L
分管储存－20℃

环孢霉素 A，0.2mg/ml（附录 3J）

加入 2.0ml 浓度为 50mg/ml 的环孢霉素储存溶液（SandimmuneⅣ；Sandoz）到 500ml 的 37℃ 的 DMEM 完全培养基中（见有关配方）。10ml 分装避光保存于－70℃。

D10HG 培养基（单元 13.4）

450ml 的 Dulbecco 高糖改良 Eagle 培养基（DMEM）
√50ml FBS，56℃热失活 1h
5ml 200mmol/L L-谷氨酰胺
2.5ml 10 000U/ml 青霉素/10 000μg/ml 链霉素（Life Technologies）
4℃储存 1 个月

DAPI 防脱色封固液（单元 4.8）

将 1mg 4′,6-二脒-2-苯茚二酮（DAPI）溶于 10ml 水中。在加入水之前加入几滴甲醇以促进溶解。分装到管子中，铝箔纸包裹储存于－20℃保存（可稳定 1 年多）。

在使用前加入 1～2μl DAPI 储存溶液到 1ml 的苯二胺的防脱色溶液中（见有关防脱色封固液的试剂配制）。于－20℃避光保存。如果溶液颜色变黑，应该重新配制。

DAPI 染色溶液（单元 4.3）

将 0.2μg/ml 的 4′,6-二脒-2-苯茚二酮（DAPI；Sigma；终浓度为 5.7×10^{-7}mol/L）加入到 McIlvaine 缓冲液中，pH7.0（见有关配方）。4℃储存于箔纸覆盖的染色缸中 1 周。

DAPI 染色溶液（单元 4.4）

将 1mg 4′,6-二脒-2-苯茚二酮（DAPI）溶解到 10ml 水中。在使用前加入几滴甲醇

以促进 DAPI 的溶解。分装到铝箔纸包裹的管中－20℃下储存一年余。在使用前，用 PBS 按照 1/1000 的比例稀释。用铝箔纸包裹管子，4℃下储存几周。

DAPI 染色溶液（单元 8.6）

将 1.5mg 的 4′,6-二脒-2-苯茚二酮（DAPI）混合到 0.5ml 的 H_2O 中，并储存于－20℃。在使用前，将 10μl DAPI 储存液加入 15ml 的苯二胺 dihydrochloride 防脱色剂中（终浓度为 2μg/ml DAPI；见有关防脱色固定剂的相关配方）。1ml 管分装－20℃下保存 6 个月。

DC 胆固醇储存溶液，2.0mg/ml（3.7mmol/L）（单元 12.9）

用氯仿清洗玻璃检测管 3 次在空气中晾干。称重 10.0mg 的（二甲基环戊烷）氨甲酰胆固醇到管中，用约 4ml 的氯仿溶解，然后加入氯仿直至终体积为 5ml。－20℃下用玻璃容器避光密闭储存 3 个月。

DC 胆固醇粉可从 Sigma 购买到也可按照 Gao 和 Huang 的方法配制（1991）。

DdeI 消化缓冲液，5×（单元 9.9）

HPLC 级 H_2O
500mmol/L NaCl
√250mmol/L Tris · Cl，pH7.9
50mmol/L $MgCl_2$
5mmol/L DTT
－20℃下储存 1 年

去离子甲酰胺，见甲酰胺

变性丙烯酰胺凝胶溶液（附录 3F）

25.2g 尿素（超纯）
6.0ml 38%丙烯酰胺/2%双丙烯酰胺
√6.0ml 10×TBE
27ml H_2O（总体积 60ml）
用 Whatman1 滤纸过滤
4℃下储存 2～4 周

以上为配制 4%丙烯酰胺测序胶的体积，若需要配制 6%或 8%的胶，则分别提高丙烯酰胺/双丙烯酰胺的量到 9.0ml 和 12.0ml，并减少水的体积以保持总体积的恒定。

丙烯酰胺溶液变质较快，特别是暴露于光或留在室温中的时候。

变性缓冲液（单元 9.3）

0.4mol/L NaOH
3.0mol/L NaCl

室温中储存1年

变性液（单元4.8）

将70ml甲酰胺（Ultrapure或deionized；见有关配方）。与10ml的20×SSC，pH7.0（见有关配方）混合。如果必要的话，用HCl调节pH至7.0，然后用水即将终体积定于100ml。储存于4℃。每周新鲜配制，或大量使用时也可配制多次。

变性溶液（单元8.6）

28ml甲酰胺（去离子且为分子生物级纯度；70%*V/V*的终浓度）
√4ml 20×SSC
8ml H_2O
用HCl调节pH至7.0
在4℃储存至1周

变性溶液（单元9.2）

1mol/L NaOH
2.0mol/L NaCl
√0.025 EDTA
0.0001%（*m/V*）溴酚蓝（在使用前加入）
新鲜配制

变性溶液（附录3G）

20ml 10mol/L NaOH
120ml 5mol/L NaCl
加 H_2O 至1L
新鲜配制

Denhardt溶液，100×

10g聚蔗糖400
10g聚乙烯吡咯（烷）酮
10g BSA（Ⅴ级）
加水至500ml
过滤灭菌
25ml等分，－20℃保存

DEPC处理的水（单元7.1和单元11.1）

将0.2ml的二乙基焦磷酰胺（DEPC）加入到100ml的灭菌水中并剧烈振荡。高压灭菌失活残留的DEPC。使用前新鲜配制。

注意：DEPC可能为一种致癌物，使用时需小心。

DEPC 处理溶液（单元 9.10）

将焦碳酸二乙酯（DEPC，Sigma）配制成 0.05%～0.1%（V/V）溶液，溶液过夜储存，然后高压灭活残余的 DEPC。室温下储存。

注意：DEPC 是一种可疑的致癌物应该小心操作。

脱色液（单元 9.10）

10%（V/V）甲醇
10%（V/V）乙酸
80%（V/V）H_2O
室温储存

检测缓冲液（单元 2.1）

√100mmol/L Tris·Cl，pH7.4
150mmol/L NaCl
0.3%（V/V）Tween 20
由无菌储存液配制并室温储存，在使用前检测有无细菌污染。

检测液（单元 4.8）

5μg/ml 荧光素-卵白素 DCS（Vector Laboratories）
1μg/ml 罗丹明结合的绵羊抗地高辛 Fab 片段（Boehringer Mannheim）
√4×SSC，pH7.4
1%（m/V）BSA
在使用前即时准备

显影液（单元 2.1）

120g 碳酸盐（终浓度 0.28mol/L）
2ml 37%甲醛（终浓度 0.02%）
加 H_2O 至 4L
新鲜配制

硫酸葡聚糖，60%（单元 10.3）

24g 硫酸葡聚糖
26.6ml H_2O
55℃水浴中加热 4～5h 以溶解，4℃储存 6 个月

右旋糖，5.2%（单元 12.9）

将 2.6g 的右旋糖溶于约 40ml 无菌水中，然后用水稀释到 50.0ml（也可准备 5×的浓度）。通过 0.2μm 的膜无菌过滤。5.0ml 分装于管子中，－20℃储存。

DGGE上样缓冲液（单元10.3）

20%（m/V）蔗糖
√10mmol/L Tris·Cl，pH7.8
√1mmol/L EDTA，pH8.0
0.5%（m/V）溴酚蓝

透析缓冲液（附录3A）

储存液：
√360ml 1mol/L Tris·Cl，pH7.5
√72ml 0.5mol/L EDTA，pH8.0
72ml 5mol/L NaCl（终浓度0.72mol/L）
无菌过滤
室温储存
工作液：在透析时，用3500ml水稀释49ml工作液，储存于4℃。

透析缓冲液Ⅰ（单元5.3）

√20mmol/L Tris·Cl，pH7.5
1mmol/L Na_2EDTA
500mmol/L精胺
用储存液新鲜配制

透析缓冲液Ⅱ（单元5.3）

√20mmol/L Tris·Cl，pH7.6
√1mmol/L EDTA，pH8.0
100μmol/L精胺
用储存液新鲜配制

二乙醇胺缓冲液（单元2.2）

100mg $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
97ml二乙醇胺（Sigma）
800ml H_2O
用1mol/L HCl调节pH至9.8
用H_2O稀释至1L
室温下可储存于黑色瓶中6个月

焦碳酸二乙酯，见DEPC

分化培养基（单元13.2）

95ml Dulbecco改良Eagle培养基（DMEM；Life Technologies）

5ml 马血清（HyClone；5%终浓度）

100×青霉素/链霉素溶液（Life Technologies；100U/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素终浓度）

4℃储存；至少可稳定 1 个月

地高辛检测溶液（单元 4.4）

用 4×SSC（见有关配方）/1%（*m*/*V*）BSA（Ⅴ级）将荧光素或罗丹明结合的绵羊抗地高辛 Fab 片段（Boehringer Mannhein）稀释成 2μg/ml。每天新鲜配制。

磷酸氢二钠缓冲液，pH7.0（单元 4.3）

0.2g KCl（2mmol/L 的终浓度）

8.0g NaCl（0.14mol/L 的终浓度）

0.2g KH_2PO_4（1.4mmol/L 的终浓度）

1.16g Na_2HPO_4（8mmol/L 的终浓度）

1L H_2O

如果需要的话用一价碱或二价碱调节 pH 至 7.0

室温下储存 6 个月

偏端霉素 A 染液（单元 4.3）

将 0.2mg/ml 的偏端霉素 A（Sigma；3.5×10^{-4} mol/L 的终浓度）溶解在 McIlvaine 缓冲液中，pH7.0（见有关配方）。小管分装，－20℃下避光保存 6 个月。

二硫苏糖醇，见 DTT

DMEM/10%FBS 培养基（单元 13.3）

Dulbecco 改良必需培养基（Irvine Scientific）含：

2mmol/L L-谷氨酰胺（Irvine Scientific）

2.5g/ml 两性霉素 B（Irvine Scientific）

50μg/ml 庆大霉素（Irvine Scientific）

10%胎牛血清（FBS；Irvine Scientific）

4℃储存≤2 个月

DMEM/F12/N2/FGF 培养基（单元 13.3）

1∶1 的比例混合 DMEM 与 F12 培养基（Irvine Scientific）含：

2.5mmol/L L-谷氨酰胺（Irvine Scientific）

3.1g/L D-葡萄糖（Irvine Scientific）

5μg/ml 胰岛素（Sigma）

100μg/ml 转铁蛋白（人源无铁离子；Sigma）

20nmol/L 孕酮（Sigma）

100μmol/L 四甲烯二胺氟安定（Sigma）
30nmol/L 亚硒酸盐
4℃储存≤2个月

DNA 抽提缓冲液（单元 12.7）

√50mmol/L Tris · Cl，pH8.0
√2mmol/L EDTA
0.5%（*m*/*V*）Tween20（Sigma）
室温下储存1年
在使用前，添加 400μg/ml 蛋白酶 K
在此缓冲液中 SDS 可取代 Tween20。

DNA 疫苗溶液（单元 13.2）

在无菌盐水中（140mmol/L NaCl）或疫苗用的 PBS（见有关配方）中准备 2mg/ml 的浓缩 DNA 储存溶液；储存液放置在－70℃。于注射前用相同的缓冲液稀释到预期的终浓度。对于小鼠，在单一的时期可注射≤200μg DNA。

关于 DNA 疫苗的纯化和预先检测，见 CPHG 单元 13.2 的讨论部分。

DNase Ⅰ，1mg/ml（单元 4.4）

将 1mg DNase Ⅰ（Worthington）溶于 1ml 0.15mol/L NaCl/90%（*V*/*V*）丙三醇中。分装于 20μl 的管中－20℃下储存1年余。在使用前，即时在冷的无菌水中稀释到 1/1000（1μg/ml）或 1/250（4μg/ml）。冻存储存液，未使用的工作液则应该丢弃。

DNase Ⅰ溶液（单元 4.5）

储存液：
√20mmol/L Tris · Cl，pH7.5
1mmol/L $MgCl_2$
50mmol NaCl
1mg DNase Ⅰ（Boehringer Mannheim）
轻轻摇匀（不用旋涡振荡）
4℃储存过夜以使试剂完全溶解
加入1个体积的丙三醇在－20℃下做长期储存（≥1年）
对该溶液做定期活性校正是必要的。
工作溶液：在使用前用 DNase 稀释剂（见有关配方）按 1∶5000 稀释。
稀释剂量根据 DNase 储存液的活性而变化。

DNase 消化缓冲液（单元 12.3）

√10mmol/L Tris · Cl，pH7.5
√10mmol/L $MgCl_2$

2mmol/L $CaCl_2$
50U/ml DNase Ⅰ
新鲜配制

DNase Ⅰ稀释液（单元 4.5）

√7.5ml 1mol/L Tris·Cl，pH7.6～7.8（500mmol/L 的终浓度）
0.75ml 1mol/L $MgCl_2$（50mmol/L 的终浓度）
6.75ml H_2O
1ml 管分装保存于－20℃（至少可以稳定 1 年）

dNTP 混合物，1.25mmol/L（单元 9.5）

从 Perkin-Elmer 购买 25mmol/L 的 dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP。在微量离心机以最高转速离心 30s，将每种 dNTP 各 50μl 混合并加入 800μl 的双蒸水（总体积为 1ml，各 dNTP 的浓度为 1.25mmol/L）。每管分装 100μl 保存。

dNTP：dATP、dTTP、dCTP 和 dGTP

浓缩储存液：从商业供应商处（推荐 Amersham Pharmacia Biotech）购买的脱氧核糖核苷三磷酸（dNTP）均为即用的 100mmol/L 溶液（方便运输和储存）或也可使用低压冻干形式。如果用低压冻干形式，就用去离子水溶解到预期的浓度，如 30mmol/L，然后用 1mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0。通过 UV 分光光度计在波长 260nm 下检测每种 dNTP 的实际浓度，可用以下的衰减系数：A，15，200；C，7，050；G，12，010；T，8，400。

4 种 dNTP 混合：将含有等摩尔量的所有 4 种 DNA 前体的 dNTP 溶液混合。例如，2mmol/L 4dNTP 混合液分别含有 2mmol/L 的 dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP。

3dNTP 混合：同 4dNTP 一样准备混合液，但按需求省掉某种特殊的 dNTP，如在一个标记反应中，2mmol/L 3dNTP 混合液（减去 dATP）包含了 dCTP、dGTP 和 dT-TP 各 2mmol/L。

将所有的 dNTP 和 dNTP 混合液分装保存于－20℃（在 1 年内稳定）

DOM（得克斯特原始培养基）（单元 13.4）

√350ml 1×IMDM
75ml 马血清（HS），在 56℃热失活 1h
√75ml FBS，56℃热灭活 1h
25ml 10 000U/ml 青霉素/10 000μg/ml 链霉素（Life Technologies）
√500μl 0.1mol/L 2-ME
√500μl 1mmol/L 促肾上腺皮质激素
在 4℃下储存 1 个月
血清中的个别团状聚集必须要筛掉（支持方案 5）。

D-PBS（Dulbecco's PBS）（单元 13.3）

√PBS
0.1g/L $CaCl_2$
0.1g/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
1.0g/L D-葡萄糖
0.036g/L 丙酮酸盐
4℃下储存≤2 个月

dsDNA 标准（单元 11.2）

用从 Life Technologies 处购买的 0.5mg/ml 的 dsDNA 配制 500μg/ml 的标准液。为配制浓度为 50、100 和 250μg/ml 的液体，用适量的 TE 缓冲液（见相关配方）来稀释。最好在使用前检测标准品的完整性（如在琼脂糖凝胶上电泳；附录 3G）和浓度（如吸光度；附录 3D）。

DTT（二硫苏糖醇），1mol/L

15.45g DTT
100ml H_2O
过滤除菌；不要高压灭菌
−20℃储存

E. coli DNA 聚合酶 Ⅰ 缓冲液，10×（附录 3E）

√500mmol/L Tris·Cl，pH7.5
100mmol/L $MgCl_2$
10mmol/L DTT
0.5mg/ml BSA 或明胶
4℃下 1 个月内储存

*Eco*R Ⅰ 限制性内切核酸酶/甲基化酶缓冲液，10×（单元 5.4）

100μl 32mmol/L S-腺苷甲硫氨酸（New England Biolabs；终浓度为 0.8mmol/L）
80μl 1mol/L $MgCl_2$（终浓度 20mmol/L）
800μl 5mol/L NaCl（终浓度 0.5mol/L）
√2ml 1mol/L Tris·Cl，pH 7.5（终浓度 0.5mol/L）
40μl 1mol/L 二硫苏糖醇（DTT；终浓度 10mmol/L）
980μl 无菌 H_2O（总体积 4ml）
分装于小管（0.21ml）可在−80℃下储存 1 年

EDTA，0.5mol/L，pH8.0

186.1g $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$（乙二胺四乙酸钠）

700ml H_2O

√在添加 50ml 10mol/L NaOH 时，摇晃

加 H_2O 至 1L

在样品完全溶解后开始滴定。EDTA，甚至是盐形式，在这个浓度下也很难溶解，除非 pH 提高到 7 和 8 之间。加热溶液也可以促进 EDTA 的溶解。

含 0.025%（*m/V*）秋水仙素的 EDTA 缓冲液（单元 4.2）

8.0g NaCl

0.2g KH_2PO_4

0.2g KCl

1.15g Na_2HPO_4

0.2g EDTA 二钠盐

溶解于 1L 去离子水中，并高压灭菌。在使用前，37℃预热，并在每 100ml 缓冲液中加入 5μl 0.5%（*m/V*）的秋水仙素（见有关配方）。

β-孕二烯酮，200mmol/L（单元 12.5）

24.8mg（活化）β-孕二烯酮（溶于水；Sigma）

加入 H_2O 至 20ml

用 0.2μm 的硝酸纤维素过滤膜无菌过滤

4℃下储存 1 年

乙醇/乙酸溶液（单元 11.2）

3mol/L 的乙酸钠储存液：准备 408.24g/L（3mol/L）的乙酸三羟化物盐。将 172.4ml 冰乙酸用水稀释到 1L 来准备 3mol/L 的乙酸，并用 3mol/L 的乙酸溶液滴定 3mol/L 的乙酸盐溶液，使 pH 到达 6.0。用 0.2μm 的滤膜过滤。室温下储存 6 个月。

工作液：用 950ml 100%的乙醇来稀释 50ml 3mol/L 的乙酸钠储存液。室温下储存 2 周。

溴化乙锭分析溶液（附录 3D）

√10ml 10×TNE 缓冲液

89.5ml 水

0.45μm 过滤器过滤

√加入 0.5ml 1mg/ml 的溴化乙锭

溴化乙锭分析溶液

用 H_2O 配制浓度为 10mg/ml 的储存溶液（如 0.2g 溶于 20ml）。充分混合，用锡箔纸包裹瓶子于 4℃下黑暗中保存。不要无菌处理。在使用前，用电泳缓冲液（如 1×TAE 或 TBE；见有关配方）或水将它稀释为 0.5μg/ml 的浓度或其他预期的浓度。

溴化乙锭工作液常常用于染琼脂糖凝胶，以便在紫外光下观察到核苷酸。胶应该放

置在一个玻璃皿上并以足够量充分覆盖玻璃皿，轻轻晃动并让它保持 10～30min。如果必需的话，胶可在电泳缓冲液或水中摇动适合的时间脱色以减少背景荧光。此外，一块胶也可在适当浓度的溴化乙锭工作液中直接跑胶。

注意：溴化乙锭是一种有毒物和强的诱变剂。在接触溴化乙锭时应该戴手套，在称量溴化乙锭时还应该戴口罩。用特定的容器来处理已被污染的固体和液体材料。

以 F-10 为基础的肌原细胞生长基本培养基（单元 13.2）

400ml 1×Ham F-10 营养素混合物（Life Technologies）

100ml 胎牛血清（HyClone；终浓度 20%）

50μl 25μg/ml 成纤维细胞基本生长因子，人源（bFGF；Promega）溶于 0.5%（*m/V*）BSA/1×PBS（见有关配方）；分装，冻存于－20℃，融化后仅使用一次（终浓度 2.5ng bFGF/ml）

5ml 100×青霉素/链霉素（Life Technologies；终浓度 100U/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素）

4℃储存，至少稳定 1 个月

以 F-10/DMEM 为基础的肌原细胞生长基本培养基（单元 13.2）

使用 200ml 1×Ham F-10 营养物和 200ml DMEM 培养基配制 F-10 为基础的肌原细胞生长基本培养基（见配方）。

FACS 染色缓冲液（13.2 单元）

4%（*V/V*）胎牛血清（HyClone）

10mmol/L HEPES

√PBS（1×终浓度）

4℃储存

FACS 终止（缓冲）液（单元 13.2）

1.8μl 1mg/ml 二碘化丙锭（终浓度 1μg/ml）

36μl 50mmol/L 苯乙基-β-D-硫葡糖苷酶（PETG；1mmol/L 终浓度；浓度可进行选择）

√1.8ml FACS 染色缓冲液，冰上预冷

新鲜配制

PETG 抑制细胞内源性 β-半乳糖苷酶活性，但这点常常不一定需要。

FBS（胎牛血清）

购买 FBS（干冰运输）在使用前以冻存状态保存（－20℃下储存不到 1 年）。在融化后于 4℃下储存 3～4 周。若在此期间内还不使用的话，则在无菌条件下分装到小管冻存。仅留下一个小管在 4℃下以方便使用，在 3～4 周后应该丢弃。避免反复冻融。

热失活的 FBS 可从商业厂家处购买到，也可以在实验室里通过在 56℃下加热 30～

60min 来进行。

成纤维细胞培养基（单元 4.5）

准备含或不含 10%FBS 的 α-MEM（Life Technologies），4℃下储存几周。

如果需要的话，可选择适当的试剂以用于体细胞杂种（单元 3.1）。

聚蔗糖-泛影钠，1.077g/L（单元 10.3）

用磁力搅拌器以低速度将 64g 的聚蔗糖（相对分子质量 400 000；Sigma）和 0.7g 的 NaCl（12mmol/L 的终浓度）溶解在 600ml 水中。加入 99g 泛影葡胺钠（0.16mol/L 的终浓度；Sigma）。当所有成分都溶解后，加水到 1L。用 0.22μm 的过滤器无菌过滤。4～25℃ 6 个月内储存，避免阳光直射。

聚蔗糖-泛影钠溶液也可购买到（Ficoll-Paque；Amersham Biosciences）。

聚蔗糖上样缓冲液，10×（单元 9.3）

25%（*V/V*）聚蔗糖（Pharmacia Biotech）溶于 H_2O

0.25%（*m/V*）溴酚蓝

√10mmol/L EDTA

−20℃下储存 6 个月

固定液，3∶1（单元 9.9）

3ml 100%甲醇

1ml 冰乙酸

每日新鲜配制

荧光素缓冲液（单元 11.2）

25μl 烟酸己可碱 33258 溶液（购自 FluoReporter Blue dsDNA 定量试剂盒；分子探针）

10ml TNE 缓冲液（购自 FluoReporter Blue dsDNA 定量试剂盒）

10ml 水

烟酸己可碱 33258 溶液含有浓度为 1∶4 DMSO/H_2O。TNE 缓冲液是 10mmol/L Tris·Cl（pH7.4）/2mol/L NaCl/1mmol/L EDTA。

荧光素标记的卵白素（单元 8.6）

溶解 1ml 的荧光素-卵白素 DCS（Vector Laboratories）到 1ml H_2O 中。−20℃储存。在使用前，稀释 50μl 储存液到 9.95ml PNM 缓冲液（见有关配方；终浓度 5μg/ml）中。−20℃下储存。

氟脱氧尿嘧啶（FUdR），10μmol/L（单元 8.1）

将 1.2mg FUdR 加入 5ml H_2O 中，用经过无菌过滤的蒸馏水按 1∶100 的比例稀

释。在1.5ml的微量离心管子中每管分装1ml，−20℃下可储存6个月。

注意：FUdR是危险品。

甲醛缓冲的丙酮固定剂（单元4.7）

缓冲液：

0.2g $Na_2HPO_4 2H_2O$（4.8mmol/L）

1g KH_2PO_4（24.5mmol/L）

300ml 蒸馏水

4℃下可储存6个月

工作液：

15ml 缓冲液

22.5ml 丙酮（终浓度7.75mol/L）

12.5ml 37%甲醛（终浓度9.3% *V/V*）

置于染色缸中4℃下可储存1周。

甲醛上样缓冲液（附录3H）

√1mmol/L EDTA pH 8.0

0.25%（*m/V*）溴酚蓝

50%（*V/V*）丙三醇

室温下储存3个月

甲醛，去离子

将500ml甲醛（纯度很关键）与50g 20～50孔离子交换树脂（Bio-Rad）室温下作用30min。通过Whatman no.1滤纸过滤2次。分装为50ml，储存在−20℃。解冻后仅使用一次。

注意：甲醛是有毒物质。

甲醛上样缓冲液，2×

√去离子甲醛

0.05%（*m/V*）溴酚蓝

0.05%（*m/V*）二甲苯蓝FF

√20mmol/L EDTA

不需要无菌处理

−20℃下储存

甲酰胺预杂交/杂交液（附录3H）

√5×SSC

√5×denhardt杂交封闭液

50%（*m/V*）甲酰胺

√1% (*m*/*V*) SDS

√100μg/ml 鲑鱼精子

首先将前 4 种成分混合。在使用前，通过煮沸 10min 然后加到 FPH 溶液中超声变性鲑鱼精子（见有关配方）

商业化的甲酰胺通常可以满足使用需要。如果液体带有黄色，则可按照以下的方法去除离子：每 100ml 甲酰胺加入 5g 混合离子交换树脂 [如 Bio-Rad AG 501-X8 或 501-X8 (D) 树脂]，室温下搅拌 1h，用 Whatman no. 1 号滤纸过滤。

注意：甲酰胺为致畸因子，接触时须小心。

甲酰胺冲洗液，50%和 65% (*V*/*V*) (单元 8.6)

20ml 或 26ml 的甲酰胺（已去离子且为分子生物纯度级别）

√4ml 20×SSC

加 H_2O 至总体积为 40ml

用 HCl 调节 pH 至 7.0

4℃储存 1 周

甲酰胺冲洗缓冲液，60% (*V*/*V*) (单元 9.9)

30ml 甲酰胺（已去离子且为分子生物纯度级别，American Bioanalytical）

√5ml 20×SSC

15ml H_2O

用 6mol/L HCl 调节 pH 至 7.0 到 7.1

每天新鲜配制

裂殖缓冲液，5× (单元 11.1)

将 6.06g Tris 碱（Sigma；分子生物学纯度级别）溶解到 175ml DEPC 处理水（见有关配方）中。用冰乙酸调节 pH 至 8.1。加入 12.3g 的乙酸钾（用未开封的新试剂或专用瓶保存的试剂）和 8.04g 的乙酸镁（Sigma；分子生物学纯度级别）将体积调节到 250ml (pH 约为 8.4)。用 0.2μm 的过滤器无菌过滤，−20℃下储存 6 个月。

冻存培养基（附录 3J）

√45ml 完全 RPMI

√45ml FBS，热失活

通过 0.2μm 的过滤器无菌过滤

在无菌条件下加入 10ml DMSO

−20℃下储存

冻存培养基（单元 13.4）

√80ml 1×IMDM

20ml DMSO

过滤除菌
加入 10 000U/ml 的肝素钠（终浓度 20U/ml）
4℃下储存 1 年
在使用前即刻加入 10μg/ml 的无菌过滤的 DNase

G418，40mg/ml（单元 12.5）

4g（有活性的）G418（Geneticin；Life Technologies）
0.1mol/L HEPES，pH7.5，至 100ml
用 0.2μm 的硝酸纤维素膜无菌过滤
4℃下储存 6 个月

硫酸 G418，50mg/ml（单元 13.4）

将 1mol/L HEPES（Sigma）稀释 10 倍于水中。制备 100mmol/L 的缓冲液。根据所购买的G418 的纯度（如 Life Technologies）（附带数据单上列出毫克有效蛋白质/克）来估算有效蛋白质的总毫克数。用 100mmol/L HEPES 稀释 G418 至 50mg 有效蛋白质/ml。用约 1 滴 10mol/L NaOH/ml 来调节 pH 至 7.30，使用 pH 计来调节，使用 pH 计前，要确保电极浸泡在水中并完全清洗以去除有毒污染物，pH 会慢慢地上升。以少量分装于－20℃下储存 3～5 年。避免反复冻融。解冻后的 G418 在 4℃下可保存 2 个月。

凝胶上样缓冲液，6×

0.25%（*m/V*）溴酚蓝
0.25%（*m/V*）二甲苯蓝 FF
40%（*m/V*）蔗糖或 15%（*m/V*）聚蔗糖或 30%（*V/V*）丙三醇
4℃储存（如果使用聚蔗糖可在室温下储存）
该缓冲液无需灭菌处理。在本配方中蔗糖、聚蔗糖 400 和丙三醇可互换。也可尝试其他浓度（如 10×）。

吉姆萨染色（单元 3.1）

将 2g 的吉姆萨染料（Gurrs improved R66；Bio/Medical Specialties）和 32ml 丙三醇预热到 60℃。再加入 100ml 预温丙三醇并在室温下搅拌 1h。用锡箔纸包裹装盛容器在 60℃下孵育过夜。加入 132ml 纯乙醇并在室温下搅拌 2～3h。用 0.45mm 的过滤器（Nalgene type CN）。放置至少 2 周后可以使用。室温下储存几个月。

吉姆萨染色 5%（*V/V*）（单元 4.7）

将吉姆萨染料（Merck）按 1∶20（*V/V*）的比例溶解在 Sorensen 缓冲液（见有关配方）中。4℃下储存至 3 天。

L-谷氨酰胺，0.2mol/L（100×）

解冻 L-谷氨酰胺（Life Technologies），分装成合适的比例，然后冻存。为了方便，如果配制 100ml 的培养基，则 L-谷氨酰胺可储存于 1ml 的小瓶中，如果配制 500ml 的培养基，则可将 L-谷氨酰胺储存于 5ml 的小瓶中。−20℃下储存 1 年内使用。

生长培养基（附录 3J）

√500ml 完全 RPMI 培养基
√100ml FBS，热失活
5ml 100×谷氨酰胺溶液（Life Technologies）
5ml 100×抗生素/两性霉素 B 溶液
5ml 100×HEPES（Life Technologies）
用 0.2μm 过滤器无菌过滤
4℃下储存 1 年。

吸取 3ml 的液体到 60mm×15mm 的培养皿中，另外 0.5ml 到 LB 培养基（见有关配方）中培养以检测培养基的无菌性。37℃下孵育 24h 以上以检测有无污染。

GST 溶液（单元 12.8）

√PBS 含：
2%（V/V）山羊血清
0.2%（V/V）Triton X-100
4℃下储存 1 个月

GTE 溶液（单元 5.1）

9.1ml 无菌 H_2O
250μl 2mol/L 葡萄糖
√400μl 0.5mol/L EDTA，pH8.0
√250μl 1mol/L Tris·Cl，pH8.0
4℃下储存 1 个月

HBSS（Hanks 平衡盐溶液）

0.40g KCl（5.4mmol/L）
0.09g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$（0.3mmol/L）
0.06g KH_2PO_4（0.4mmol/L）
0.35g $NaHCO_3$（4.2mmol/L）
0.14g $CaCl_2$（1.3mmol/L）
0.10g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$（0.5mmol/L）
0.10g $MgCl_2 \cdot 7H_2O$（0.6mmol/L）
8.0g NaCl（137mmol/L）

1.0g D-葡萄糖（5.6mmol/L）

0.01g 酚红（0.01%；可选择浓度）

加入 H_2O 至 1L 并调节 pH 至 7.4

无菌过滤并储存于 4℃

HBSS 也可从一些商业厂家购买到。商业化的 HBSS 含或不含 $CaCl_2$ 和 $MgCl_2$。可对以上成分进行选择，通常它们对于试验并无影响；但在某些情况下，它们可能是有害的。在设计个别实验方案时，应该咨询后再了解是否应该含有上述成分。

HBSS，0.1×（单元 12.5）

√1 份 1×HBSS（无葡萄糖或酚磺酞）

√9 份 PBS，pH7.5（用 HCl 调节 pH）

用 0.2μm 的硝酸纤维素膜来无菌过滤

4℃下储存 1 年

HCl，1mol/L

将以下成分混合：

913.8ml H_2O

86.2ml 浓 HCl（表 A.1.1）

不需要无菌处理

HeBS（HEPES-缓冲盐），2×（单元 12.3 和单元 12.6）

16.4g NaCl（终浓度 0.28mol/L）

11.9g HEPES（终浓度 0.05mol/L）

0.21g Na_2HPO_4（终浓度 1.5mmol/L）

800ml H_2O

用 5mol/L NaOH 滴定至 pH 为 7.05

加入水至 1L

用 0.45μm 的硝酸纤维素膜无菌过滤

检测转染效率

分装为 50ml，−20℃中储存

pH 对于转染效率来说特别重要。最佳 pH 为 7.05～7.12。

不同批次的 2×HeBS 的转染效率不同。应该检测不同批次的转染效率。可通过以下方法来进行快速检测，将 0.5ml 的 2×HeBS 与 0.5ml 的 250mmol/L $CaCl_2$ 混合，并旋涡混匀。如果在显微镜下容易见到沉淀形成，则该 HeBS 可以使用。如果没有形成沉淀，那么应该在某个环节出错。

HeBS，2×（单元 12.5）

2.382g HEPES

3.28g NaCl

42.4mg Na_2HPO_4
加 42.5mg H_2O 到 200ml
用 5mol/L NaOH 调节 pH 到 7.12
用 0.2μm 的硝酸纤维素膜无菌过滤
4℃下储存 6 个月

HeBS，2×，pH7.05（单元 12.7）

20mmol/L HEPES
135mmol/L NaCl
5mmol/L KCl
5.5mmol/L 右旋糖
0.7mmol/L Na_2HPO_4
调节 pH 至 7.05
分装，－20℃下保存 6～12 个月
精确地调节 pH 非常关键。

鲱鱼精 DNA，10mg/ml（单元 2.4 和单元 10.4）

将 1g 干燥的鲱鱼精 DNA 加入到 100ml 无菌水中并搅拌过夜。超声于 100W 作用 5～10s 的间隔直至 DNA 溶液不再黏稠。煮沸 10min，分装，－20℃下储存。

鲱鱼精 DNA，2mg/ml（附录 3G）

将 200mg 高分子质量的鲱鱼精 DNA 加入 50ml 水中并搅拌过夜以重悬 DNA。通过超声剪切 DNA 或用下述方法反复吸取 DNA：通过 18G 针吸取到 60ml 吸管然后再通过 23G 针。煮沸 DNA 10min 并稀释到 100ml 的终体积。用 10ml 管分装，－20℃下 1 年内储存。

高-盐洗液（单元 10.3）

√10ml 10%（*m/V*）SDS（0.1%终浓度）
√100ml 20×SSC（2×终浓度）
加 H_2O 到 1L
室温下使用

烟酸己可碱 33258 分析溶液（附录 3D）

将烟酸己可碱 33258 溶于水中，使其浓度为 1mg/ml。4℃下储存液可储存超过 6 个月。在使用前，加入 10μl 1mg/ml 的储存液到 100ml 用 0.45μm 滤膜过滤的 1×TNE 缓冲液（见有关配方）。

烟酸己可碱 33258 染液 A 和 B（单元 4.3）

储存液：将 50μg/ml 烟酸己可碱 33258（Calbiochem 或 Sigma）溶于水中。锡箔纸包裹 4℃下储存 3 个月内使用。

染色液 A：用 PBS（见相关配方）稀释到 0.5μg/ml。4℃下锡箔纸包裹储存 1 个月内使用。

染色液 B：用 PBS（见相关配方）稀释到 25μg/ml。4℃下锡箔纸包裹储存 1 个月内使用。

烟酸己可碱 33258 储存液，250μg/ml（单元 8.4）

将 25mg 烟酸己可碱 33258 粉（2-［2-｛4-羟苯基｝-6-苯并咪唑基-6-［1-甲基-4-piperazyl］-苯并咪唑基］在玻璃瓶中溶于 100ml H_2O 中，用锡箔纸包裹 4℃下储存 1 个月。

HPB（高-磷酸钠缓冲液），5×（单元 5.2）

2.5mol/L NaCl
0.5mol/L Na_2HPO_4
0.026mol/L EDTA
调节 pH 至 7.0
高压
室温下储存 6 个月内使用

人 C_0t-1 DNA，10mg/ml（单元 11.2）

加入 925μl 100%乙醇和 75μl 3mol/L 乙酸盐，pH5.2（见有关配方），到 500μl 1μg/μl 人 C_0t-1 DNA（Life Technologies）。以 14000*g* 的速度离心。吸取上清液并让沉淀物溶于 50μl DEPC-处理水（见有关配方）。－20℃下储存 6 个月。

杂交缓冲液（单元 9.3）

√3×SSPE
7.0%（*m*/*V*）十二烷基磺酸钠
0.5%（*m*/*V*）Catnation 脱脂牛奶粉
0.5mg/ml 经超声处理的、已变性的鲑鱼精 DNA
√5mmol/L EDTA
6%（*m*/*V*）聚乙二醇 8000（Baker）
－20℃储存
使用前预热过滤（0.45μm）

杂交混合液（单元 4.5）

6.8ml 甲酰胺
2.5ml 50%（*m*/*V*）硫酸葡聚糖（高压灭菌并与 4℃储存；可稳定 1 年余）
√0.63ml 20×SSC
充分混合并于 4℃储存 3 个月
本配制方法中杂交混合液各成分的终浓度为 55%甲酰胺、10%硫酸葡聚糖与

1×SSC。

杂交混合液，pH7.0（附录 3G）

500ml 甲酰胺
√10ml 100×Denhardt's 溶液
√50ml 10%（*m/V*）SDS
150ml 50%（*m/V*）硫酸葡聚糖（相对分子质量为 5 000 000）
√250ml 20×SSC
√40ml 2mg/ml 鲱鱼精 DNA
室温下储存
使用前用 pH 试纸检测 pH

杂交溶液（单元 5.2）

√0.5% SDS
√0.5×HPB
√5.5×SSC
每日新鲜配制

杂交溶液（单元 8.6）

97μl 甲酰胺（经去离子，分子生物学纯度级别）
√15μl 20×SSC
36.5μl H_2O
√1.5μl 10mg/ml 超声处理的鲑鱼精 DNA
4℃下储存 1 个月

杂交溶液（单元 10.3）

与预杂交液的成分结合（见有关配方）但除去水。加入 1.1ml 60%硫酸葡聚糖（见有关配方）。新鲜配制并室温下保存。

杂交洗液（单元 4.8）

将 50ml 甲酰胺（超纯或去离子；见有关配方）与 10ml 20×SSC（pH7.0）混合（见有关配方）。如果必要的话，用 HCl 调节 pH 至 7.0，然后用水补充终体积至 100ml。4℃储存。每周准备新鲜溶液，或频繁使用配制的溶液（超过 50 片/周）。

杂交缓冲液，pH6.8（单元 4.3）

将一粒氨丁磺酰胺胶囊（Metricpak，MicroEssential Laboratory）溶于 100ml 水中，pH6.8。作为工作液，将 5ml 储存液溶于 95ml 水中。两种溶液均在室温下储存。

氢化可的松，1mmol/L（单元 13.4）

将 36.3mg 氢化可的松（组织培养级别，MW362.5；Sigma）加入到 400μl 100%

乙醇中并在37℃下预热5min。加入无菌水至总体积为10ml并尽可能混匀。将1ml加入到9ml无菌水中以产生1mmol/L的工作液。4℃下储存1个月。

氢化可的松在乙醇中并不真正溶解，而是形成一种黏合状物。然而它应该在1mmol/L工作液中完全溶解。

潮霉素，80mg/ml（单元12.5）

10^7U潮霉素（Calbiochem）
加H_2O至350ml
用0.2μm的硝酸纤维素膜无菌过滤
4℃下储存6个月

低渗液（单元8.6）

1份0.75mol/L（5.6mg/ml）KCl
1份0.8%（*m/V*）二水枸橼酸三钠
1份H_2O
每次使用前新鲜配制

低渗液/部分固定液（单元9.9）

溶解1.2g二水枸橼酸三钠（Sigma）于80ml水中，然后加水至终体积为100ml[最终浓度为1.2%（*m/V*）]。室温下可保存1周。使用时，按3∶1（*V/V*）与固定液稀释（见配方）。每天都要新鲜配制。

IMDM（Iscove改良的Dulbecco培养基），2×（单元13.4）

取1L包装好的IMDM粉末（Life Technologies）加入冲洗干净的装有450ml水的培养瓶中。用培养基冲洗包装然后加入培养瓶中。加入40.3ml 7.5%（*m/V*）碳酸氢钠（组织培养级；Sigma），然后使最终体积为500ml。消毒灭菌后于4℃条件下储存1个月。如果出现沉淀（通常是储存1个月后），则准备新的培养基。

避免使用洗过的培养瓶；肥皂残留物可能会对造血细胞产生毒害作用。

免疫过氧化物酶底物工作液（单元4.7）

10mg 3-氨基-9-乙基卡比马唑（Sigma；终浓度为0.9mmol/L）
3ml *N*，*N*-二甲基甲酰胺（终浓度为0.72mol/L）
50ml 0.02mol/L乙酸盐缓冲液（终浓度为0.02mol/L）
50μl H_2O_2，用之前加（终浓度为8.3mmol/L）

碘克沙醇梯度工作液（单元12.3）

15%碘克沙醇：
√50ml 10×PBS
√0.5ml 1mol/L $MgCl_2$

0.5ml 2.5mol/L KCl
100ml 5mol/L NaCl
125ml Optiprep（碘克沙醇；nycomed）
0.75ml 0.5%酚红
加 H_2O 至 500ml
消毒灭菌

25%碘克沙醇：

√50ml 10×PBS
√0.5ml 1mol/L $MgCl_2$
0.5ml 2.5mol/L KCl
100ml 5mol/L NaCl
200ml Optiprep（碘克沙醇；nycomed）
1.0ml 0.5%酚红
加 H_2O 至 500ml
消毒灭菌

40%碘克沙醇：

√50ml 10×PBS
√0.5ml 1mol/L $MgCl_2$
0.5ml 2.5mol/L KCl
333ml Optiprep（碘克沙醇；nycomed）
加 H_2O 至 500ml
消毒灭菌

在工作液可以清楚地与其他液体区分开来的情况下酚红可以略去（此工作液可能带有病毒）。

60%碘克沙醇：

500ml Optiprep（碘克沙醇；nycomed）
0.25ml 0.5%酚红
√0.5ml 1mol/L $MgCl_2$
0.5ml 2.5mol/L KCl
加 H_2O 至 500ml

虽然 Optiprep 含 60%碘克沙醇，这种液体实际含有 54%碘克沙醇。

所有的碘克沙醇工作液均可在 4℃ 条件下储存 6 个月以上。

乳糖储存缓冲液（单元 13.5）

√25mmol/L Tris·Cl，pH7.4
60mmol/L NaCl
1mg/ml 精氨酸
50mg/ml 乳糖
经 0.2μm 的过滤器过滤，消毒灭菌

−20℃下可保存6个月

N-十二烷基肌氨钠，10%（单元5.2和单元5.4）

溶解100g *N*-十二烷基肌氨钠（肌氨酰）于700ml（可能需要加热）。加水至1L。室温下可储存6个月以上。

注意：小心不要吸入干燥的*N*-十二烷基肌氨钠粉末。

LB培养基和培养板

10g 胰蛋白胨
5g 酵母粉
950ml H_2O
1ml 1mol/L NaOH
加水至1L

对于液体培养基：高压灭菌25min，然后冷却至≤50℃。加抗生素、颜色检测试剂和必需的营养物质（表A.1.2）。如果不立即使用，在室温下存储时间≤1年（在没有抗生素的情况下）。

表A.1.2 细菌培养基的添加物

添加物[a]	储存浓度/(mg/ml)	终浓度/(μg/ml)
抗生素		
氨苄青霉素	4	50
卡比青霉素（溶于50%的乙醇）	4	50
氯霉素（溶于甲醇）	10	20
庆大霉素	10	15
卡那霉素	10	30
链霉素	50	30
四环素[b]（溶于70%的乙醇）	12	12
显色剂		
异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（IPTG）	23.8（100mmol/L）	23.8（100μmol/L）
溶于*N*，*N*-二甲基甲酰胺的5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-乳糖苷（Xgal）	20	20

a. 除非特别说明，所有的添加物须溶于灭菌的蒸馏水中。除四环素和卡比青霉素须−20℃保存，其他所有的添加物须4℃保存。b. 光敏感性；避光保存储存液。

LB培养基原始的配方中不包括NaOH。许多不同的LB配方仅仅是所加的NaOH的量不同。尽管NaOH将pH调到了约为7，但是培养基没有被明显的缓冲；因此，当接近饱和的LB培养基中的培养增加时，培养基的pH下降。

对于培养板：在高温灭菌前，在培养基成分上加15g琼脂或琼脂糖，用加热搅拌以溶解琼脂。高温灭菌，冷却至50℃，加抗生素、颜色检测试剂和必需的营养物质，倒30～40ml到100mm无菌的一次性Petri培养皿，然后让其凝固。存放在4℃，包装好

的原来的袋子里。

培养基在50℃会保持液体状态，但是如果温度降到45℃以下时就会迅速凝固。

对于大多数的应用来说，存放培养板以前，建议将其放在室温下2～3d干燥或在孵卵器中打开盖子37℃干燥30min，或在层流净化罩中干燥。

LBMM（长期骨髓培养基）（单元13.4）

√500ml BBMM

50μl 50U/μl重组的人类白细胞介素6（hIL-6；Biosource International），无菌

100μl 50ng/μl重组的人粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子（hGM-CSF；Biosource International），无菌

50μl 50ng/μl重组的人类干细胞因子（hCSF；Biosource International），无菌

20μl 50ng/μl重组的人类白细胞介素3（hIL-3；Biosource International），无菌（非必需的）

在4℃可保存2周

重组的人类白细胞介素3（10ng/ml）在培养细胞增殖的最大限度需要时加入。例如，在随后的一周需要对收集的非黏着的细胞做大量的试验。但是作者已经提醒：在培养中IL-3持续存在会减少在试管中长期培养启动细胞的寿命。

LCR混合物（单元2.2）

20μl 1mol/L KCl

√20μl 10×耐热连接酶缓冲液（最终2×）

20μl 10mmol/L NAD^+（Sigma，在－20℃可存放6个月）

40μl 0.1%（V/V）Triton X-100

准备新鲜的

乙酸锂（lithium acetate）/Ttris/EDTA溶液（单元5.3）

3ml 1mol/L乙酸锂（过滤灭菌，在室温存放）

√3ml 100mmol/L Tris·Cl，pH 7.5

√3ml 10mmol/L EDTA，pH 8.0

21ml H_2O

准备新鲜的

上样缓冲液，1×（单元9.3）

80%（V/V）甲酰胺

0.1%（m/V）溴酚蓝

0.1%（m/V）二甲苯胺FF

10mmol/L NaOH

√1mmol/L EDTA

在－20℃下保存≤6个月

注意：甲酰胺有危险性，警慎使用。

上样缓冲液（单元 9.7）

√70%（V/V）1×TBE 缓冲液
30%（V/V）甘油
0.1%溴酚蓝

上样缓冲液（单元 11.2）

4.0ml 甘油（酶等级）
√0.9ml DEPC 处理过的 H_2O
0.1ml 0.25%（*m/V*）二甲苯胺 FF/0.25%（*m/V*）溴酚蓝
室温保存 1 个月

低浓度盐溶液洗涤

√20ml 10%（*m/V*）SDS（0.1%终浓度）
√10ml 20×SSC（0.1×终浓度）
加 H_2O 至 2L
用 2 个 1L 容量的瓶子 65℃水浴加热
Low-T dNTP 混合液，10×(单元 11.2)
25μl 100mmol/L dGTP（0.5mmol/L 1×）
25μl 100mmol/L dATP（0.5mmol/L 1×）
25μl 100mmol/L dCTP（0.5mmol/L 1×）
25μl 100mmol/L dTTP（0.2mmol/L 1×）
√415μl DEPC 处理过的 H_2O
−20℃保存 2 个月

LPS 溶液，750μg/ml（单元 4.2）

溶解 25mg 脂多糖（LPS；*E. coli* 血清型 0111：B4；Sigma）到 33.3ml 完全 RPMI（见配方）。分成 3 或 4 份，−20℃保存 6 周。最终浓度为 50μg/ml，每 1.5ml 培养加 0.1ml LPS

淋巴细胞培养基（单元 4.2）

√完全 RPMI
15%FBS
2%（V/V）植物凝集素（Life Technologies）
5U/ml 肝素
4℃保存数周

溶解缓冲液（单元 4.5）

√2.5ml 20%（*m/V*）SDS

√10ml 0.5mol/L EDTA
√20ml 1mol/L Tris·Cl，pH7.4
67.5ml H_2O
室温保存（保质期至少一年）

m-AMSA，5mg/ml（单元 4.5）

分解 *N*-[4-(9-胺苯吖啶)-3-甲基苯] 甲磺酸盐（m-AMSA；Drug Synthesis Branch，National Cancer Institute）到 10mg/ml DMSO 和一体积的水。过滤灭菌，4℃保存。

MAC 低渗液（单元 4.7）

母液：

0.14702g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$（终浓度 1mmol/L）
0.3728g KCl（终浓度 5mmol/L）
0.1626g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$（终浓度 0.8mmol/L）
0.5844g NaCl（终浓度 10mmol/L）
3.4230g 蔗糖（终浓度 10mmol/L）
3.74ml 甘油（终浓度 50mmol/L）
小容量用无菌水分解各组分，在 1L 容量瓶中将其混合。调节 pH 为 7.0。通过 1.2μm 过滤器过滤，在 4℃下可保存数月。

工作液：

0.8 份母液
√1.2 份完全 RPMI/5%FBS
新鲜配制（4℃无菌条件下可保存 1 周）
此溶液包括生理学浓度的各种离子、蔗糖和甘油。

Master 杂交混合液（单元 4.4）

√1ml 20×SSC
0.5ml 20mg/ml 无核酸酶的 BSA
1.5ml 无菌 H_2O
2ml 50%(*m*/*V*) 葡聚糖硫酸盐（Pharmacia Biotech，mol. wt. 500 000，高压灭菌）
4℃下保存，6 周内用完。

Master 杂交溶液（单元 4.8）

√5ml 甲酰胺（超纯或去离子）
√1.0ml 20×SSC，pH7.0
1g 硫酸葡聚糖（Sigma）
70℃水浴，2～3h，周期性漩涡搅动分解
用 pH 试纸检查 pH；如有需要，调节至 pH7.0

用水加至10ml

用1ml aliquots在−20℃保存，≤1年

Mbo Ⅰ 缓冲液，10×和1×（单元5.4）

10×缓冲液：准备100mmol/L Tris · Cl，pH 8.0（见配方），包含1mol/L NaCl，室温保存1年。

1×缓冲液：稀释1份10×缓冲液到9份水中，加10mmol/L 2-巯基乙醇。使用前准备。

McIlvaine缓冲液，pH5.6、pH7.0、pH7.5

pH5.6：43ml 0.1mol/L柠檬酸

pH7.0：18.1ml 0.1mol/L柠檬酸

pH5.6：8ml 0.1mol/L柠檬酸

以上各个组分与100ml 0.2mol/L Na_2HPO_4 混合。检查pH，如有需要，用柠檬酸或 Na_2HPO_4 调节。室温下保存不超过6个月。

2-ME（2-巯基乙醇），0.1mol/L（单元13.4）

在通风橱里，用100ml水分解0.7ml约14.3mol/L 2-巯基乙醇（Sigma）。无菌过滤，在−20℃ 的2ml aliquots中保存，不超过3年。在4℃ thawed aliquots中保存（至少2个月）。

培养基A（单元13.5）

Modified Eagle培养基（MEM；Life Technologies）包含：

50U/ml盘尼西林

50μg/ml链霉素

80μg/ml妥布拉霉素（Eli Lilly）

100μg/ml头孢他定（Eli Lilly）

100μg/ml伊米配能-西司拉丁钠（Merck）

5.0μg/ml两性霉素B

10μg/ml DNase（Type Ⅱ-S；来自牛胰腺；Sigma）

0.5mg/ml二硫苏糖醇

准备新鲜的培养基，4℃保存

培养基B（单元13.5）

√BEGM补充：

50U/ml盘尼西林

50μg/ml链霉素

80μg/ml妥布拉霉素

100μg/ml头孢他定

100μg/ml 伊米配能-西司拉丁钠
5.0μg/ml 两性霉素 B
4℃保存 2 周

培养基 C（单元 13.5）

√BEGM 补充：
50U/ml 盘尼西林
50μg/ml 链霉素
40μg/ml 妥布拉霉素
50μg/ml 头孢他定
50μg/ml 伊米配能-西司拉丁钠
4℃保存 2 周

MES 缓冲液，12×（单元 2.4 和单元 11.1）

70.4g 2-(*N*-吗啉代）甲磺酸（MES）游离酸水化物
193.3g MES 普罗比妥钠盐（Sigma）
√800ml DEPC 处理过的水

混合并加至 1000ml。pH 应调节至 6.5～6.7。0.20μmol/L 过滤器过滤。不要高压灭菌。在 2～8℃保存。当颜色变成黄色时丢弃。

甲氨蝶呤，10μmol/L（单元 4.1）

分解 0.5mg 甲氨蝶呤（氨甲蝶呤；Sigma）到 100ml HBSS 中（见配方）。用 0.22μm 过滤器进行无菌过滤。用红盖的试管（未处理的管子）分装成 5ml，每管冻存在－20℃中或者无菌条件的未处理管不超过 1 年。4℃储存 aliquo，再使用时不超过 1 个月。

注意：氨甲蝶呤有毒。

甲基纤维素培养基（单元 13.4）

√40ml 2×IMDM
√30ml FBS，56℃水浴灭活 1h
√10ml 去离子的 10% BSA
2mmol/L L-谷氨酰胺
100U/ml 盘尼西林
10μg/ml 链霉素
√100μl 0.1mol/L 2-ME
√100μl 1mmol/L 皮质醇
无菌过滤
√加 35ml 3.9%（*m*/*V*）甲基纤维素母液
振动混匀

加 30μl 人类重组白细胞介素 6（hIL-6；Biosource International）
加 20μl 50ng/μl 人类重组白细胞介素 3（hIL-3；Biosource International）
加 100μl 50ng/μl 人类重组干细胞因子（Hscf；Biosource International）
加100μl 50ng/μl 人类重组粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子（hGM-CSF；Biosource International）
加 1ml 2U/μl 人类重组促红细胞生成素（Biosource International）
在 4℃保存，使用前赶走气泡。

在第 4～7 天的时候，对于新鲜的、没有培养过的细胞加促红细胞生成素。当培养的细胞从 72h 从活体内转导时，促红细胞生成素可直接加。

甲基纤维素膜，1%（*m/V*）（单元 12.7）

在包含一个搅拌棒的 500ml 无菌瓶中，加 25g 甲基纤维素（Aldrich）到 100ml PBS 中，pH7.5（见配方），在液体循环中高压灭菌 45min，溶液冷却后，加 350ml 没有血清的纯 MEM（见配方），搅拌混合好后，在 4℃过夜。甲基纤维素一溶解就加 50ml PBS（见配方），在 4℃可存放 1～3 个月。

甲基纤维素储存液，3.9%（单元 13.4）

称 11.8g 预筛选好的（基本方案 5）甲基纤维素粉末 [4000cP（厘泊，黏度单位）；Sigma，Fisher]，并且打碎凝块。加 150ml 煮沸的水到一个洗干净的培养基瓶中并且混合均匀。让混悬液冷却至不烫手的程度。然后立即加 150ml 冰水（没有冰晶）尽可能混合均匀。在室温下静止 1h，消除气泡，然后在 4℃过夜。恢复至室温然后高压灭菌至无菌状态。如果液面明显低于起始容量，用一个 25ml 的吸量管吸取无菌水调整容量，并且搅拌使其混合均匀。

应该用一个没有清洗的培养瓶，因为肥皂残留可能对细胞有毒性。

对黏性很大的溶液应该用一个 25ml 的吸量管将其吸除。大部分甲基纤维素将贴附在吸量器里，所以当它分装时，需要留一点时间让吸量器 Tip 头中的液体完全流出。

$MgCl_2$，1mol/L

20.3g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
H_2O 定容至 100ml
$MgCl_2$有很强的吸湿性，不能储存于开口瓶或长时间贮藏。

MOPS 缓冲液，10×（附录 3H）

0.4mol/L 3-（*N*-吗啉代）丙磺酸（MOPS），pH 7.0
√0.5mol/L 乙酸钠
√0.01mol/L EDTA
4℃避光储存 3 个月以上，变黄丢弃

NaOH，10mol/L

称取 400g NaOH 溶于 450ml H_2O

加 H_2O 定容至 1L
不要灭菌消毒

NaOH/SDS 溶液（单元 5.1）

4.65ml 灭菌水
100μl 10mol/L NaOH
250μl 20%（*m*/*V*）SDS
要新鲜配制

NBT/BCIP 底液（单元 4.4）

加 220μl 75mg/ml 四唑氮蓝（NBT）溶液于二甲基甲酰胺，定容至 50ml 的碱性磷酸缓冲液中，pH 9.5（见配方），轻轻混匀（不要形成漩涡）。加入 170μl 50mg/ml 的 5-溴-4-氯-3 吲哚磷酸（BCIP）溶液至二甲基甲酰胺，再次轻轻混匀（终浓度 330μg/ml NBT 和 170μg/ml BCIP）。每次都要新鲜配制。

NBT 溶液，100×（单元 12.4）

50mg/ml 四唑氮蓝
70%（*V*/*V*）二甲基亚砜
√100mmol/L Tris · Cl，pH 8.5
−20℃（可稳定数月）保存于用铝箔纸包裹的玻璃器皿（如避光）

中和缓冲液（单元 1.3 和单元 9.9）

√900mmol/L Tris · Cl，pH 8.3
300mmol/L KCl
200mmol/L HCl
自动分流，可 4℃保存数月

中和缓冲液，1mol/L 磷酸盐，pH 6.8（单元 9.3）

79.25g Na_2HPO_4
60.25g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$
用水定容至 1L
室温储存至多一年

中和液（单元 10.4）

60g Tris 碱基（终浓度 0.5mol/L）
88g NaCl（终浓度 1.5mol/L）
用约 36ml（浓度 10.5mol/L）HCl 调 pH 至 7.0
加 H_2O 至 1L
每次转换都要新配制

中和液（附录3G）

√250ml 2mol/L Tris·Cl，pH 7.6
300ml 5mol/L NaCl
加 H_2O 至 1L
要新鲜配制

Nick 转换缓冲液（单元4.5）

√500μl 1mol/L Tris·Cl，pH 7.6～7.8
50μl 1mol/L $MgCl_2$
√10μl 25mmol/L 4dNTP 混合液
440μl H_2O
100μl 分装于－20℃储存（至少一年稳定有效）

Nick 转换缓冲液，10×（单元4.4）

2μl 100mmol/L dATP（0.2mmol/L 终浓度）
2μl 100mmol/L dCTP（0.2mmol/L 终浓度）
2μl 100mmol/L dGTP（0.2mmol/L 终浓度）
√500μl 1mol/L Tris·Cl，pH7.8（0.5mol/L 终浓度）
50μl 1mol/L $MgCl_2$（0.05mmol/L 终浓度）
7μl 2-巯基乙醇（0.2mmol/L 终浓度）
2μl 50μg/ml BSA（0.1μg/ml 终浓度）
435μl 无菌蒸馏水
50μl 分装于－20℃储存，不超过一年

NKM 缓冲液（附录3A）

28ml 5mol/L NaCl
30ml 1mol/L KCl
1.5ml 1mol/L $MgCl_2$
加 H_2O 至 1L
过滤灭菌
4℃ 储存于 500ml 无菌瓶中

细胞核裂解液（单元9.6）

每升体系中：
50ml 2mol/L Tris·Cl，pH 7.5
80ml 5mol/L NaCl
√4ml 500mmol/L EDTA
用 NaOH 调 pH 至 8.0

自动分流灭菌
无菌条件下，室温储存不超过一年

核苷混合液，10×（单元 4.8）

5μl 10mmol/L dATP（200μmol/L 终浓度）
5μl 100mmol/L dCTP（200μmol/L 终浓度）
5μl 100mmol/L dGTP（200μmol/L 终浓度）
√125μl 1mol/L Tris · Cl，pH7.2（500μmol/L 终浓度）
√12.5μl 1mol/L $MgCl_2$（200μmol/L 终浓度）
1.7μl 14.7mol/L 2-巯基乙醇（100mmol/L 终浓度）
2.5μl 10mg/ml BSA（100μg/ml 终浓度）
93.3μl H_2O（定容至 250μl）
−20℃储存，不超过一年

OLA 结合液（单元 2.2）

15μl 1mol/L KCl
√120μl 10×热稳定连接酶的缓冲液
120μl 10mmol/L NAD（Sigma）
345μl 0.1%（*V/V*）Triton X-100
须新鲜配制

Oligo 洗脱液（单元 2.1）

√1%（*m/V*）SDS
√70mmol/L 磷酸盐缓冲液，pH 7.2
用无菌母液配制并储存于室温条件下。使用前要做无菌试验。

用来 LCR 的寡核苷酸引物（单元 2.2）

必须合成 6 种寡核苷酸引物以保证和双等位基因的核酸变异的基因型对应。设计的引物 3′端交叠处要有一个单独的碱基（图 2.2.2）。所有引物的 T_m 值都在 60～65℃。用 T4DNA 连接酶将 ^{32}P 标记在引物的 5′端（附录 3E）；37℃孵育 45min 后，加入预冷的 ATP 至 1mmol/L 以完成引物的磷酸化。−20℃储存引物，最多两年。

Overgo 标记缓冲液（单元 5.2）

配制溶液 A、B、C，然后按 2∶5∶3 比例混匀。0.5ml 分装于−20℃储存，不超过 3 个月。

溶液 A：
√1ml 1.25mol/L Tris · Cl，pH8.0，含 0.125mol/L $MgCl_2$（见配方）
18μl 2-巯基乙醇
5μl 0.1mol/L dGTP

5μl 0.1mol/L dTTP

−80℃ 储存不超过一年

除含 α-^{32}P 标记的，将所有 dNTP 都加入其中。以上溶液用来标记［α-^{32}P］dATP 和［α-^{32}P］dCTP。

溶液 B：

2mol/L HEPES，pH6.6

室温保存不超过一年

溶液 C：

√3mmol/L Tris·Cl，pH 8.0

√0.2mmol/L EDTA

室温保存不超过一年

多聚甲醛溶液，4%（*m/V*）（单元 12.6 和单元 12.8）

将 20g 多聚甲醛加入 300ml H_2O 中，加热到 55～60℃。缓慢地逐滴加入 1mol/L NaOH 10min 左右直至溶液变澄清，然后冷却至室温。用 pH 试纸检测 pH 是否为 7.0～7.5（如有需要，再加 NaOH）。加入 100ml 0.5mol/L 磷酸缓冲液，pH7.0（见配方），最后加水定容至 500ml（终浓度 0.1mol/L 磷酸根离子，pH7.0～7.5）。4℃最多保存一周。

注意：多聚甲醛有毒性，其配制包括加热的过程会挥发，增加危险。采用必要的安全措施非常重要，比如在通风橱中操作。

PBS（磷酸缓冲液），pH 约 7.3

8.0g NaCl（137mmol/L）

0.2g KCl（2.7mmol/L）

2.16g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$（8.0mmol/L）

0.2g KH_2PO_4（1.5mmol/L）

加水定容至 1L

无菌过滤后 4℃存放

PBS 可以先配成 10× 的母液。加水稀释分装好的 PBS（pH7.4）可从 Sigma 购得。需大量使用时非常方便。

PBS，pH7.8（单元 9.10）

144mmol/L NaCl

10mmol/L KH_2PO_4

用 K_2HPO_4 调 pH 至 7.8

室温存放

PBS，pH7.5（单元 12.7）

135mmol/L NaCl

2.5mmol/L KCl
1.5mmol/L KH_2PO_4
8.0mmol/L Na_2HPO_4，pH 7.5
可室温存放1～2年

用于接种的PBS液（单元13.2）

√5mmol/L 磷酸缓冲液，pH7.2
140mmol/L NaCl
0.2μm 过滤器无菌过滤
4℃保存至多一个月

PBS-MK（单元12.3）

√50ml 10×PBS
√0.5ml 1mol/L $MgCl_2$
0.5ml 2.5mol/L KCl
H_2O 定容至500ml
无菌过滤
4℃保存至多两年

PCR扩增缓冲液，10×

500mmol/L KCl
√100mmol/L Tris·HCl，pH8.3
15mmol/L $MgCl_2$
0.1%（m/V）凝胶
-20℃下小分量保存
自动分流灭菌或用无菌水和母液配制

许多PCR体系的$MgCl_2$浓度是15mmol/L。最佳浓度取决于所研究的序列和引物，可能还要做预实验确定。

PCR扩增缓冲液，10×（单元10.3）

√100mmol/L Tris·HCl，pH8.3
500mmol/L KCl
-20℃保存不超过一年

PCR非离子去垢剂缓冲液（单元3.1）

50mmol/L KCl
√10mmol/L Tris·HCl，pH8.3
2.5mmol/L $MgCl_2$
0.45%（V/V）NP-40

0.45% (V/V) Tween 20
100μg/ml 蛋白酶K（使用前加入）
无蛋白酶室温存放长期稳定有效

PEG 1000 溶液，50%（m/V）（单元3.1）

加热固体聚乙烯1000（Research Products International生产）至65℃直到刚好融化，然后称取所需用移液管把液化的PEG移入配衡的玻璃管中。高压灭菌器灭菌，取5g与5ml无血清培养液混合。通常，PEG不会显著地改变培养液的pH；否则，用无菌的0.1mol/L NaOH调节到原始pH。室温下储存液态的PEG。在4℃下储存溶液，不要超过几天。

PEG溶液，40%（单元5.3）

40%PEG（聚乙烯乙二醇）4000
√10mmol/L Tris·Cl，pH7.5
100mmol/L乙酸锂
高压灭菌后，室温下可以储存几个月

胃蛋白酶溶液（单元8.5）

配制200ml的0.9%（m/V）NaCl。取20ml，用浓缩的HCl调pH为1.5，然后加入1g胃蛋白酶搅拌直到溶解。−20℃储存在5ml一次性塑料分装管中，不要反复地解冻使用。

PET溶液（附录3C）

√50mmol/L Tris·Cl，pH8.5于25℃储存
√1mmol/L EDTA
0.5% Tween 20
高压灭菌
室温下可最多储存6个月，用之前加$\frac{1}{100}$体积的20mg/ml蛋白酶K

蛋白酶K储存液是用去电离的高压灭菌蒸馏水配制的，等分成小份，−20℃下可以储存两个月。

PHA溶液（单元4.2）

用17.8ml纯RPMI（视配方而定）溶解2mg植物凝血素（PHA；净化至最好；Abbott实验室）。分装到3～4ml的分装管中，−20℃存储可达6个月。用0.1ml PHA溶液加入到1.5ml体系中可制成7.5μg/ml的最终浓度。

在最适情况下，作剂量-应答曲线（每双份3～9μg/ml），针对PHA的量测量有丝分裂指数和品系反应。每个品系的血池来自约6个月的老鼠，用C57BL/6作为对照组。

笔者发现7.5μg/ml浓度的结果最好，不管标记在瓶子上的促有丝分裂组。

苯酚，缓冲液

65℃水浴融化蒸馏的苯酚（冻存在－20℃）。加入等体积的1mol/L Tris · Cl，pH7.5（视配方而定），充分混匀，可以持续过夜。第二天，用移液管移去上层的Tris/苯酚混合物。加入水来提供一个上层。标明标签和日期，4℃储存。苯酚的分解可以通过颜色的变化来观察到分解时颜色会从澄清变为浅黄，进而浅粉红色。

苯酚/氯仿/异戊醇，25∶24∶1（V/V/V）

√25体积缓冲苯酚（底部相）
24体积氯仿
1体积异戊醇
储存于棕色玻璃瓶或用铝箔包裹的透明玻璃瓶中，4℃下不超过2个月。
有的情况下，1∶1（V/V）的苯酚/异戊醇也可以用。

苯甲磺酰氟化物，见PMSF

磷酸盐缓冲液，pH8.0，0.5mol/L（单元4.5）

473.5ml 0.5mol/L Na_2HPO_4
26.5ml 0.5mol/L NaH_2PO_4
高压灭菌，室温下储存（至少一年内稳定）
磷酸盐缓冲的盐水，见PBS

PIB（原核注射缓冲液）（单元5.3）

加10ml 1mol/L Tris · Cl，pH7.5（视配方而定）和0.2ml 0.5mol/L EDTA（视配方而定）到80ml去离子水中，加去离子水至100ml。用一个0.2μm无菌的去除内毒素的纤维素乙酸盐过滤器（如ValuPrep无菌注射过滤器，VWR Scientific）过滤该溶液。室温下储存于1ml分装管中，可达6个月。不能重复使用分装管。

PMSF溶液，100mmol/L（单元5.4）

配制一份100mmol/L的苯甲磺酰氟化物于异丙醇中，可于－20℃下储存达一年。涡流混匀，用前稀释到适当的浓度。

PMSF/TE洗脱缓冲液（单元5.1）

将20mg PMSF混合于1ml 100%的异丙醇中，65℃水浴10～15min使其溶解。储存于4℃（可以稳定几个月）。用之前，加200μl PMSF于100ml TE缓冲液中制成新鲜的PMSF/TE洗脱缓冲液（视配方而定）。

PN缓冲液（单元4.5）

√100ml 0.5mol/L磷酸钠缓冲液，pH8.0
2.5ml Nonidet P-40（NP-40）
397.5ml H_2O
室温下储存（可稳定至少一年）

PN 缓冲液（单元 4.8）

溶液 A：0.1mol/L $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$/0.1% Nonidet P-40

溶液 B：0.1mol/L $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$/0.1% Nonidet P-40

取溶液 A 到需要的量，缓缓地加入溶液 B 到 pH 为 8.0。这样需要 1/5 左右的 B 溶液，室温保存一个月。

PN 缓冲液（单元 8.6）

溶液 A：在 100ml H_2O 中溶解 6.9g NaH_2PO_4。

溶液 B：在 1000ml H_2O 中溶解 71g Na_2HPO_4。

用 30～40ml 的溶液 A 滴定溶液 B，使其 pH 至 8.0，再加 Nonidet P-40，使其最终浓度为 0.5%。

PNM 缓冲液（单元 8.6）

√500ml PN 缓冲液
25g 脱脂奶粉
0.1g 叠氮钠
于室温下混合 72h，然后转移上清液至 50ml 锥形瓶内。可以在 4℃下储存一周。

聚凝胺，4mg/ml（单元 4.7）

0.4g 抗肝素灵溴化物（聚凝胺，Sigma）
加水至 100ml
用 0.2μl 的硝化棉滤波器滤过消毒
于 4℃下储存一年。

多聚赖氨酸涂层的载玻片（单元 4.7）

准备 0.05%的多聚赖氨酸水溶液（wt/70 000～150 000，Sigma），滴一滴这种溶液到乙醇清洗过的载玻片上，再将另一乙醇清洗的载玻片盖在其上，它们中间的一滴多聚赖氨酸溶液在两载玻片上形成涂层。在空气中干燥 10min，包裹在金属箔中在－20℃下可以储存 6 个月。

多聚赖氨酸溶液（单元 11.2）

35ml 多聚赖氨酸溶液
√35ml PBS
280ml H_2O
在室温下可保存 24h

乙酸钾缓冲液，0.1mol/L

溶液 A：11.55ml/L 的冰乙酸溶液（0.2mol/L）

溶液 B：19.6g/L 乙酸钾溶液

参照表 A.1.3 调整所需要的 pH，混合 A、B 两种溶液，加水至 100ml，如果需要，过滤消毒。在室温下可保存 3 个月，对于更多的细节，见乙酸钠缓冲液。

表 A.1.3　0.1mol/L 乙酸钠钾缓冲液的配制[a]

目的 pH	溶液 A/ml	溶液 B/ml
3.6	46.3	3.7
3.8	44.0	6.0
4.0	41.0	9.0
4.2	36.8	13.2
4.4	30.5	19.5
4.6	25.5	24.5
4.8	20.0	30.0
5.0	14.8	35.2
5.2	10.5	39.5
5.4	8.8	41.2
5.6	4.8	45.2

a. 获得 CRC，1975，批准使用。

乙酸钾溶液（单元 5.1）

29.5g 的乙酸钾

加无菌消毒水至 88.5ml

再加 11.5ml 的冰乙酸

磷酸钾缓冲液，0.1mol/L

溶液 A：27.2g/L KH_2PO_4溶液（0.2mol/L）

溶液 B：34.8g/L K_2HPO_4溶液（0.2mol/L）

参照表 A.1.4 调整所需的 pH，混合指定量的溶液 A 和溶液 B，用水稀释至 200ml。如果需要就过滤灭菌。室温下保存有效期 3 个月。要知道额外细节，参照磷酸钠缓冲液。

表 A.1.4　磷酸钠钾缓冲液的配制[a]

目的 pH	溶液 A/ml	溶液 B/ml	目的 pH	溶液 A/ml	溶液 B/ml
5.7	93.5	6.5	6.9	45.0	55.0
5.8	92.0	8.0	7.0	39.0	61.0
5.9	90.0	10.0	7.1	33.0	67.0
6.0	87.7	12.3	7.2	28.0	72.0
6.1	85.0	15.0	7.3	23.0	77.0
6.2	81.5	18.5	7.4	19.0	81.0
6.3	77.5	22.5	7.5	16.0	84.0
6.4	73.5	26.5	7.6	13.0	87.0
6.5	68.5	31.5	7.7	10.5	90.5
6.6	62.5	37.5	7.8	8.5	91.5
6.7	56.5	43.5	7.9	7.0	93.0
6.8	51.0	49.0	8.0	5.3	94.7

a. 获得 CRC，1975，批准使用。

前卵白素阻滞液（单元 4.5）

√3ml 20×SSC，pH7.0
600μl 25%（m/V）BSA
3ml 25%（m/V）脱脂奶乳
8.4ml 水
混匀，1800g 离心 5min 至澄清
0.45μm 过滤器过滤灭菌
分装为 1ml 的单位，4℃保存有效期不多于 6 个月
将 25%BSA 分装为 1～25ml 的单位储存于－20℃（至少一年内稳定）

初洗显微镜玻片（单元 10.1）

将显微镜玻片放入装有 1×清洗液［由热水稀释 7×清洗液（ICN Biomedical）而成］的容器内。用试管刷刷每一个玻片。用热水一片片地冲洗。将所有的玻片置入一个洁净的大烧杯内用热水冲洗两次，再用室温下的蒸馏水冲洗两次。向装有玻片的大烧杯内注入蒸馏水保存于 4℃。在同一天再次冲洗未使用玻片。两天后，再次清洗所有未使用玻片。

预杂交/杂交缓冲液（单元 9.4）

√5ml 20×SSC
√1ml 10%（m/V）SDS
√1ml 100×Denhardt 溶液
13ml 水
室温下可储存几个月

预杂交/杂交缓冲液（单元 9.8）

将 33.5g 磷酸钠（磷酸氢二钠，七水，pH7；Sigma）和 3.75ml 磷酸（Fisher）溶解于 250ml 水中。加入 2ml 0.5mol/L EDTA（1mmol/L 终浓度）和 50ml 5mol/L 氯化钠（250mmol/L 终浓度）。加水至 700ml 总体积。加热溶液至 65℃，边搅拌边加入 70g SDS（7%终浓度）和 100g 聚乙二醇 8000（Sigma；10%终浓度）继续搅拌让溶液降温至室温。加入 100ml 10%（m/V）BSA（Sigma；1%终浓度）。加水至 1L。分装储存于－20℃不超过 6 个月。

预杂交溶液（单元 2.1）

0.25mol/L NaCl
√130mmol/L 磷酸钠缓冲液，pH7.2
√5%（m/V）SDS
10%（m/V）PEG（聚乙烯）8000
使用灭菌原料制作储存于室温。用前检查溶液细菌污染情况。

预杂交溶液（单元 5.2）

√5×Denhardt 溶液
√0.5%SDS
√0.5×HPB
√5.5×SSC
使其每日更新

预杂交溶液（单元 10.3）

√5ml 去离子甲酰胺（最终 50%）
√1.5ml 20×SSC（最终 3×）
√1ml 50×Denhardt 溶液（终浓度 1mmol/L）
0.2ml 50mmol/L 焦磷酸钠（1mmol/L）
√1ml 10%（*m*/*V*）SDS
0.2ml 5mg/ml 鲑鱼精 DNA（终浓度 100μg/ml）
1.1ml 水
鲑鱼精 DNA 在加入溶液之前要煮沸 5min。使用之前制备该溶液，并保持室温。

引物（单元 9.5）

标记引物：Met-F：5′-TCCAGAATCTGTTCCAGGACGTGC-3′用 LI-COR IRDye700 标记。

不用标记的反引物：Met-R1：5′-GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCTCAT-3′。

原核注射缓冲液，见 PIB

碘化丙染色解决方案（单元 4.4）

在 10ml 水中溶解 1mg 碘化丙。分装放到锡箔纸包缠的管中，于－20℃保存不超过一年。用之前，在 PBS 溶液中稀释 1000 倍。在 4℃锡箔纸包缠的管中保存不超过 6 个月。

蛋白激酶 K，2mg/ml（附录 3A）

49ml 水
0.5ml 1mol/L $CaCl_2$（终浓度 10μmol/L）
√0.5ml 1mol/L Tris · Cl，pH 7.5
100mg 蛋白激酶 K
在－20℃保存在 aliquot 中

蛋白激酶 K 消化缓冲液（单元 13.4）

√10mmol/L Tris · Cl，pH 7.4
0.15mol/L NaCl

√0.01mol/L EDTA，pH 8.0
√0.1%（m/V）SDS
室温下储存一年

蛋白激酶K溶解液（单元5.4）

10ml 过滤10%的十二烷基肌氨酸钠
√40ml 0.5mol/L EDTA，pH 8.0
100mg 蛋白激酶K
在加入蛋白激酶K后立即使用

蛋白激酶K溶液（单元4.8）

准备1mg/ml 蛋白激酶K，于－20℃保存在aliquot中。使用之前，在50ml的20mmol/L Tris·Cl，pH7.5中加入3μl 2mmol/L $CaCl_2$ 稀释。

蛋白激酶K溶液（单元12.3）

1mol/L NaCl
1%（m/V）的十二烷基肌氨酸钠（Sarkosyl）
100g/ml，蛋白激酶K
使其每日更新

嘌呤霉素1mg/ml（单元12.5）

0.1g 嘌呤霉素
加水到100ml
用尼龙过滤器过滤
在4℃中保存6个月

二盐酸喹吖因0.5%（m/V）（单元4.7）

在50ml水中溶解1g二盐酸喹吖因。在锡箔纸包缠的管中4℃保存不超过4周。

注意：二盐酸喹吖因有剧毒，使用时小心。

喹吖因染色溶液（单元4.3）

在50ml水中溶解0.5g喹吖因二盐酸或喹吖因氮芥。在锡箔纸包缠的管中4℃保存不超过4周。如果荧光减弱或有细菌污染就不要使用了。

喹吖因氮芥作用缓和，但是不能被染色体准备液冲洗下来，这一点不同于二盐酸喹吖因。此外，喹吖因氮芥也更贵、更致癌。

兔抗鼠免疫球蛋白抗体，1∶25（V/V）稀释（单元4.7）

一份兔抗鼠免疫球蛋白抗体（Dakopatts）
一份用1.2μm膜过滤的FBS

√23 份 TBS/FBS

保证两个循环培育的足够的量

红细胞溶解缓冲溶液（单元 13.4）

0.32mol/L 蔗糖

√10mmol/L Tris·Cl，pH 7.5

5mmol/L $MgCl_2$

1%（V/V）Triton X-100

室温下保存 6 个月

红细胞溶解溶液，10×（单元 5.4）

9.54g NH_4Cl（终浓度 1.78mol/L）

0.237g NH_4HCO_3（终浓度 0.03mol/L）

在 100ml 体系中溶解

用 0.2μm 过滤器过滤

保存于 4℃的紧闭的容器中不超过一个月

在使用前用无菌水稀释成 1×的浓度

重组腺病毒悬液（单元 13.6）

用氯化铯梯度离心纯化的重组腺病毒可以用柱纯化或层析（单元 12.2）去除掉氯化铯。纯化重组腺病毒，在 PBS 中的病毒在被纯化之后要马上使用。如果病毒被保存（如于－70℃在 PBS/10%甘油中保存）或是在冰上解冻，用无菌的 PBS 稀释成合适的浓度。

保存于冰中待用。尽快使用被稀释的病毒（1～2h）。

限制缓冲液，5×（单元 9.3）

√0.5mol/L Tris·Cl，pH 8.0

0.5mol/L NaCl

0.1mol/L $MgCl_2$

－20℃保存到 1 年

重悬缓冲液（附录 3A）

20ml 5mol/L NaCl

√10ml 1mol/L Tris·Cl，pH 7.5

1.5ml 1mol/L $MgCl_2$

加水至 1L

过滤灭菌

在 4℃下，保存在 500ml 灭菌瓶中

重悬液（单元5.4）

√15mmol/L Tris·Cl，pH 8.0
√10mmol/L EDTA（乙二胺四乙酸）
100mg/ml 无DNA酶的RNase A
用0.2μm的滤网过滤
在4℃下保存至6个月

反转录缓冲液，5×（单元10.3）

√0.25mol/L Tris·Cl，pH 8.3
0.20mol/L KCl
√0.03mol/L $MgCl_2$
0.5mg/ml BSA（牛血清白蛋白）
在4℃下保存≤6个月

RNA分离溶液Ⅰ（单元10.3）

25g 硫氰酸胍（终浓度4mol/L）
29.3ml H_2O
1.76ml 0.75mol/L 柠檬酸钠，pH 7.0（终浓度25mmol/L）
2.64ml 10%（m/V）十二烷基肌胺酸钠（终浓度0.5%）
65℃下溶解
室温下保存（有效期≥3个月）

注意：不要吸入体内硫氰酸胍并且戴手套操作。不要把硫氰酸胍暴露于酸条件中，因为可能产生氰化物气体。

RNA分离溶液Ⅱ（单元10.3）

√10ml RNA分离溶液Ⅰ
72μl 2-巯基乙醇（0.1mol/L终浓度）
在每次抽提前新配

核糖核苷三磷酸 混合物，10×（单元11.1）

√焦碳酸二乙酯处理过的水包含：
30mmol/L rGTP（核糖鸟苷三磷酸）（超纯级；Amersham Biosciences公司产品）
15mmol/L rATP（核糖腺苷三磷酸）（超纯级；Amersham Biosciences公司产品）
12mmol/L rCTP（核糖胞苷三磷酸）（超纯级；Amersham Biosciences公司产品）
12mmol/L rUTP（核糖尿苷三磷酸）（超纯级；Amersham Biosciences公司产品）
以小分量保存在－20℃下不超过3个月（如50～100μl）

运行缓冲液（单元9.10）

25mmol/L Tris碱

200mmol/L 甘氨酸
0.1%SDS（m/V）
保存在室温

超声波处理的鲑鱼精 DNA，10mg/ml

在一个聚碳酸酯管子中溶解 10mg 鲑鱼精 DNA（Worthington）于 1ml 无菌水中。超声处理 5 次，每次 30s，在最大功率下，在破裂处理过程中把管子在冰上冷却。通过凝胶电泳的方法核对 DNA 分子的大小（附录 3G）；应该处于 200～400bp。在－20℃下以 50μl 分量保存不超过 1 年。

SCE 缓冲液（单元 5.1）

1mol/L 山梨醇
0.1mol/L 柠檬酸钠
√0.06mol/L EDTA，pH 7.0
过滤除菌
室温中保存

SCE 缓冲液（单元 5.3）

1mol/L 山梨醇
100mmol/L 柠檬酸钠，pH 5.8
10mmol/L Na_2EDTA
30mmol/L 2-巯基乙醇
保存于室温（有效期一个月）

SD dropout 板子和培养基（单元 5.3）

准备 10×YNB 培养基：
　1.7g 没有氨基酸的酵母氮碱基和硫酸盐（YNB-AA/AS；Difco）
　5g 硫酸胺
　100ml 去离子水
　高压灭菌可以在室温下保存几个月
准备 SD dropout 板子：
　加 250ml H_2O 到 500ml 的烧瓶中
　加 10g 细菌琼脂（Difco）
　高压灭菌，然后凉至 50～60℃加：
　50ml 10×YNB 培养基
　50ml 20%（m/V）葡萄糖
加营养补充物少于指示营养：
　15mg L-腺嘌呤半硫酸盐（Ade；终浓度 30μg/ml）
　10mg L-组氨酸盐酸（His；终浓度 20μg/ml）

20mg L-亮氨酸（Leu；终浓度 40μg/ml）
30mg L-色氨酸（Trp，终浓度 6μg/ml）
5mg 尿嘧啶（Ura；终浓度 10μg/ml）
加无菌水至 500ml
混合均匀并倒入无菌的 $100mm^2$ Petri 氏板子中
允许过夜变硬
在 4℃下保存达几个月

例如，对于 SD-Ura-Trp 板子，使用除了尿嘧啶和色氨酸以外的所有营养素。对于液体培养基，简单地从配方中除去琼脂。

SDS，20%（m/V）

溶解 20g SDS（十二烷基硫酸钠或十二烷基磺酸钠）于 100ml 水中并搅拌。加热溶液可能是必需的。

将粉末轻轻混匀，用 0.45μm 的过滤器进行过滤消毒。

SDS 样本缓冲液，2×（单元 9.10）

√100mmol/L Tris · Cl，pH6.8
4%（m/V）SDS
0.1%（m/V）溴酚蓝
20%（V/V）甘油
在室温下保存
在使用前加 200mmol/L 二硫苏糖醇或 8%(V/V)2-巯基乙醇

葡聚糖凝胶 G-50（单元 4.5）

缓慢加入 2g 葡聚糖凝胶 G-50（制药生物技术）到 300ml 水中。待胶体凝固后进行高压灭菌。在室温下保存 6 个月（制药维持灭菌）。

测序酶反应缓冲液，5×（单元 2.1）

√200mmol/L Tris · Cl，pH7.5
200mmol/L $MgCl_2$
250mmol/L NaCl
在 4℃保存 4～8 周

血清气道培养基，5%（单元 13.5）

279ml DMEM（高糖成分；Life Technologies）
279ml Ham's F-12 营养素混合物（Life Technologies）
6ml 100×MEM 非必需氨基酸（Life Technologies）
√30ml FBS
0.72ml 0.12U/ml 胰岛素（Regular Iletin；Eli Lilly）

100μg/ml 链霉素
在 4℃保存 2～4 周

这种由 Eli Lilly 公司生产的 Regular Iletin 胰岛素用 10ml 的玻璃瓶进行包装，单位是 100U/ml。

硅烷化玻璃载玻片（单元 8.5）

将 2ml 3-氨基丙基三甲基硅烷（Sigma）和 98ml 丙酮混合，制备 2%（V/V）的硅化烷溶液。将玻片在硅化烷溶液中浸泡 20s。在丙酮清洗 2 次，每次 15s，然后风干。在室温下储存。

硝酸银染色溶液（单元 2.1）

将 1g 硝酸银（烘干保存；谨慎处理）溶解于 1L 消毒且去离子的双蒸水（终浓度 0.006mol/L）中。室温下保存于暗瓶中。

片段大小标准品，100bp（单元 11.2）

50μl 1mg/ml DNA ladder（Life Technologies）
√5μl 1mol/L Tris · Cl，pH8.0
√5μl 0.5mol/L EDTA，pH8.0
√440μl 加样缓冲液
在 4℃保存 1 个月

制片辅助材料（单元 8.1）

排架管耙：在火焰上加热巴斯特管的尖端，然后在离尖端 2.5cm 的地方弯曲，使其成 90°。

制片器械：可以从作者处获得（L. J.）。

氨苄培养基，每升（单元 12.8）

20g 胰蛋白胨
5g 酵母提取液
0.5g NaCl
加水至 950ml
用 5mol/L NaOH 调整 pH 至 7.0
高压灭菌，在室温下保存 6 个月
在使用前加 5ml 无菌的 2mol/L $MgCl_2$ 和 1ml 50mg/ml 的氨苄青霉素

SOC 培养液

35g 酵母提取液
20g 胰蛋白胨
0.5g NaCl

2.5ml 1mol/L KCl
加水至 960ml
用 5mol/L NaOH 调整 pH 至 7.0
高压灭菌 25min
冷却至 50℃，然后加：
10ml 1mol/L $MgCl_2$，灭菌
10ml 1mol/L $MgSO_4$，灭菌
20ml 葡萄糖，过滤灭菌
4℃保存 1 年

乙酸钠盐，3mol/L，pH5.2

称取 408g 三水乙酸钠溶于 800ml 水中
用 3mol/L 冰乙酸调 pH 到 5.2
用冰定容至 1L
过滤除菌

乙酸钠缓冲液 0.1mol/L

溶液 A：11.55ml 冰乙酸（0.2mol/L）
溶液 B：27.2g 乙酸钠三水合物（$NaC_2H_3O_2 \cdot 3H_2O$）

按照表 A.1.3 对 pH 的要求，将溶液 A 和 B 混合，然后用水稀释至 100ml。如需要则进行过滤灭菌。在室温下保存 3 个月。

如果制备表 A.1.3 列出的 pH 之间的缓冲液，可以通过制备最接近的高 pH 缓冲液，然后用溶液 A 滴定。

缓冲液也可以制备成 5 倍或 10 倍的浓度。因为乙酸盐缓冲液 pH 变化是浓度依赖性的，所以其 pH 必须进行滴定校正。

碳酸氢钠/碳酸钠缓冲液，pH9.0，1mol/L（单元 2.2）

7.98g $NaHCO_3$
0.55g Na_2CO_3
加水至 100ml
在室温下保存 1 年

硼酸钠，1mol/L pH8.0（单元 11.2）

61.83g 硼酸
√900ml 焦碳酸二乙酯处理水
用 1mol/L NaOH 调节 pH 到 8.0
加到 1L 用 0.2μm 过滤器过滤
在室温下保存达 6 个月

肝素钠溶液，500USP U/ml（单元 4.2）

在无菌条件下混合 0.5ml 10 000USP U/ml 无菌肝素钠（J. A. Webster）和 9.5ml 完全 RPMI（见配方）。在 4℃下可以保存达一周。

磷酸钠缓冲液，0.1mol/L

溶液 A：27.6g/L $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$（0.2mol/L）

溶液 B：53.65g/L $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$（0.2mol/L）

参考表 A.1.4 要求的 pH，混合指示体积的溶液 A 和溶液 B，然后用水稀释到 200ml。如果需要的话，无菌过滤。在室温下保存达 3 个月。

如果制备表 A.1.4 中列出的 pH 之间的缓冲液，可以通过制备与之最接近的较高 pH 的缓冲液再用溶液 A 滴定来得到。

如需要缓冲液也可配制为 5～10 倍浓度的溶液。由于磷酸钠缓冲液的浓度可随 pH 的改变而改变，浓缩液的 pH 应该通过等分稀释来检验。

超声波裂解的基因组 DNA（单元 4.5）

溶解 10mg 针对目标物种的特异性基因组 DNA 或探针 DNA 于 10ml 水中，然后置于－20℃至接近冻结。用最大频率和能量声波裂解 30s。要检查单链的大小，在 100℃溶解 1μg 3min，置冰上，与 100～1000bp 的 DNAMarker 一起进行 2%的琼脂糖胶电泳，EB 染色，DNAMarker 不需要变性。如果片段过大，将 DNA 再次置－20℃使接近冻结并重复声波处理，处理时间延长。储存于 4℃（3 个月以下）或－20℃（一年以上）。

超声波裂解的鲑鱼精 DNA，10mg/ml（单元 4.4）

溶解 10mg 鲑鱼精 DNA（Worthington）于 1ml 无菌水中，置于聚碳酸酯纤维管中，最大能量声波处理 5min，每次 30s。破裂间将管置冰上。凝胶电泳检查片段大小（应在 200～400bp）。50μl 分装储存，一年内－20℃储存。

Sorensen 缓冲液（单元 4.7）

66.7mmol/L KH_2PO_4（9.078g/L）

66.6mmol/L $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$（11.870g/L；Merck）

调整 pH 至 6.8

4 个月内 4℃储存

Sorensen 磷酸缓冲液，pH6.8（单元 4.3）

溶液 A：9.08g/L（66mmol/L）KH_2PO_4（pH 约 4.5）

溶液 B：16.89g/L（62mmol/L）$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$（pH 约 9.0）

将 510ml 溶液 A 和 490ml 溶液 B 混合成 pH6.8 缓冲液。如果需要，可以通过调整两种溶液的容量，将 pH 调整到 5.0～8.2。6 个月内所有溶剂均室温保存。

亚精胺，1mol/L（单元10.4）

将34ml无菌水加入5g亚精胺［N-(3-aminopropyl)-1,4-butarediamine］
－20℃ 分装储存

SSC，20×

175g NaCl（3mol/L）
88g柠檬酸三钠（$Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$；0.3mol/L）
加H_2O至800ml
用1mol/L HCl调整pH至7.0
加水至1L。

SSPE，20×

800ml水
175g NaCl（3mol/L）
7.4g EDTA（20mmol/L）
24.0g NaH_2PO_4（0.20mmol/L）
用10mol/L NaOH（约6.5ml）调整pH至7.4
加水至1L

SSPE-T，10×、6×、1×（单元2.4）

900mmol/L NaCl
60mmol/L NaH_2PO_4
√6mmol/L EDTA，pH7.4
0.005% Triton X-100
用水稀释至适当浓度，一个月内室温保存

染色液（单元2.4）

准备2.2μg/ml streptavidin R-phycoerythrin（分子探针）和0.5mg/ml 6×SSPE-T中的acetylated BSA。现用现配。

染色液（单元9.10）

50%（V/V）甲醇
0.05%（m/V）考马斯亮蓝R
10%（V/V）乙酸
40%（V/V）水
室温下保存

酶反应标准稀释剂（附录3E）

√200mmol/L Tris·HCl，pH7.5

500μg/ml BSA（Pentax Fraction Ⅴ）
10mmol/L 2-巯基乙醇
一个月内4℃保存

反应终止液（单元7.5）

90%（V/V）甲酰胺
0.1%（m/V）溴酚蓝
0.1%（m/V）二甲苯胺

2×储存液（单元12.2）

√10mmol/L Tris·HCl，pH8.0
100mmol/L NaCl
0.1%（m/V）牛血清白蛋白（BSA）
50%（V/V）甘油
用灭菌器过滤
4℃储存一年以下

抗生蛋白链菌素溶液（单元4.4）

√PBS配方：
1%（m/V）BSA
0.1%（V/V）Tween 20
3μg/μl 抗生蛋白链菌素
现用现配

抗生蛋白链菌素涂层的微量滴定盘（单元2.2）

往1×PBS（pH7.0，见配方）中加50μl的25μg/μl的抗生功能蛋白链菌素，再加到96孔微量滴定板每一个孔的底部。用塑料封皮封住滴定板并且4℃储存12h至6个月。

洗脱液（附录3G）

√5ml 20×SSC
√10ml 10%（m/V）SDS
加水至1L
现用现配

洗脱液（附录3H）

√1%（m/V）SDS
√0.1×SSC
√40mmol/L Tris·Cl，pH 7.5～7.8

室温下贮藏一年要剥离甲酰胺，需要在使用前将其与甲酰胺1∶1混合。

底物缓冲液（单元2.1）

√100mmol/L Tris·Cl，pH 9.5
100mmol/L NaCl
50mmol/L $MgCl_2$
在无菌的库存条件下室温可无限期保存。使用前检查溶液是否被细菌污染。

蔗糖裂解液（附录3A）

109.4g 蔗糖
700ml H_2O
√10ml 1mol/L Tris·Cl，pH 7.5
5ml 1mol/L $MgCl_2$
10ml Triton X-100
加水至1L
过滤消毒存放在4℃ 500ml的瓶子中。

T low E缓冲液（单元11.2）

√10ml 1mol/L Tris·Cl，pH 8.0
√0.2ml 0.5mol/L EDTA，pH 8.0
√900ml DEPC处理过的 H_2O（焦碳酸二乙酯处理水）
室温下高压灭菌可储存6个月

T4 DNA连接酶缓冲液，5×（单元5.4）

√2mol/L Tris·Cl，pH 7.6
50mmol/L $MgCl_2$
50mmol/L ATP
50mmol/L 二硫苏糖醇（DTT）
25%（*m*/*V*）聚乙二醇8000（PEG 8000）
−20℃保存1年

T4多核苷酸激酶缓冲液，10×（单元2.1）

√500mmol/L Tris·Cl，pH7.5
√1mmol/L EDTA
500mmol/L $MgCl_2$
50mmol/L 二硫苏糖醇
1mmol/L 亚精胺
4℃保存时间不超过1个月或者−20℃保存不超过6个月

T4 多核苷酸激酶缓冲液，10×（单元 9.2）

√700mmol/L Tris · Cl，pH7.6
√100mmol/L $MgCl_2$
50mmol/L 亚精胺
－20℃冰冻保存。

T4 多核苷酸激酶缓冲液，10×（单元 9.2）

√500mmol/L Tris · Cl，pH7.5
500mmol/L $MgCl_2$
50mmol/L DTT
0.5μg/ml 牛血清白蛋白或明胶贮存在－20℃不超过 6 个月或贮存在 4℃不超过 1 个月

T4 多核苷酸激酶反应缓冲液，10×（单元 7.5）

√500mmol/L Tris · Cl，pH7.5
80mmol/L $MgCl_2$
20mmol/L 二硫苏糖醇
分装保存在－20℃

TAE（Tris/acetate/EDTA）电泳缓冲液，50×

242g Tris 碱
57.1ml 冰乙酸（表 A.1.1）
37.2g $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$（2mmol/L）
加水至 1L
这种溶液通常不需消毒，Tris 碱和乙酸对应 40mmol/L Tris 乙酸。

TAE 电泳缓冲液，10×（单元 12.8）

24.2g Tris 碱
5.71ml 冰乙酸
37.2g $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$（2mmol/L）
加水至 1L
室温下无限期保存

TBE（Tris/borate/EDTA）电泳缓冲液，10×

108g Tris 碱（890mmol/L）
55g 硼酸（890mmol/L）
√40ml 0.5mol/L EDTA，pH 8.0（20mmol/L）
加水至 1L

10×和 5×TBE 往往会随时间的推移而沉淀。如果方便，立即稀释并且不断搅拌至 2×或者 1×。这种溶液通常状况下不需要消毒。

TBS（Tris-buffered saline），pH7.5（单元 12.7）

√50mmol/L Tris・Cl，pH7.5
√1mmol/L EDTA
150mmol/L NaCl
室温保存 1～2 年

TBS/FBS（单元 4.7）

10mmol/L 0.5mol/L Tris 碱
90ml 0.15mol/L NaCl（终浓度 0.135mol/L）
调 pH 至 7.6
4℃可储藏多达 6 个月
使用前，用 1.2μm 过滤器加 2.5%（V/V）过滤的 FBS。

TE 缓冲液

√10ml 1mol/L Tris・Cl，pH 7.4、7.5 或者 8.0（或其他需要的 pH；终浓度 10mmol/L）
√2ml 0.5mol/L EDTA，pH8.0（终浓度 1mmol/L）
加水至 1L

TE79/10（单元 12.5）

√1mmol/L Tris・Cl，pH7.9
√0.1mmol/L EDTA
用 0.2μm 硝化棉过滤器消毒
4℃可储藏多达一年

TEN（Tris/EDTA/NaCl）溶液，10×（附录 3A）

√9ml 1mol/L Tris・Cl，pH7.5
√24ml 0.5mol/L EDTA，pH8.0
9ml 5mol/L NaCl
过滤消毒
储存于室温

末端转移酶反应缓冲溶液，pH6.6，5×（单元 2.1）

1mol/L 二甲胂酸钾（小心操作）
√125mmol/L Tris・Cl，pH6.6
1.25mg/ml BSA
－20℃左右储存

培养基（TB）

900ml H_2O
12g 胰蛋白胨
24g 酵母提取液
4ml 甘油
高压锅蒸 20min 后冷却至 60℃
加入 100ml 无菌的磷酸钾溶液
于 4℃下存储一年以下

磷酸溶液的配置：将 2.31g（0.17mol/L）KH_2PO_4 及 12.54g（0.72mol/L）K_2HPO_4 溶于水，然后置于高压锅灭菌 20min。

四环素，1mg/ml（单元 12.5）

0.1g 四环素（Sigma）
50%（V/V）乙醇至 100ml
−20℃下存储 6 个月

液体培养基（单元 13.4）

RPMI 培养基含：
√30%（V/V）FBS，56℃下加热活化 1h
20U/ml 肝素
10μg/mg 链霉素
2mmol/L L-谷氨酰胺
4℃下存储 1 个月

热稳定连接酶缓冲溶液，10×（单元 2.2）

√200mmol/L Tris · Cl，pH8.0
100mmol/L $MgCl_2$
10mmol/L 二硫苏糖醇（DTT）
−20℃下存储 1 个月

脱氧胸腺嘧啶核苷，1mmol/L（单元 4.1）

将 25mg 脱氧胸苷（Sigma）溶于 100ml HBSS（见配方）。用 0.22μm 孔径的过滤器过滤除菌。取 5ml 于未灭菌处理的容器中，−20℃下存储不超过 1 年。5ml 的部分溶液于 4℃下存储 6 个月。

脱氧胸苷，1mmol/L（单元 4.3 和单元 4.8）

将 2.4mg 脱氧胸苷溶于 10ml 水。过滤除菌，并取 1.5ml 于微量离心管。−20℃下储存 6 个月以下。

TMAC 溶液（单元 9.2）

将 657.6g 四甲基氯化铵（摩尔质量为 109.6）溶于 1L 水中。使用 Whatman 1 号滤纸过滤溶液，并通过测其 3 倍稀释溶液的折射率计算其浓度。稀释后溶液的摩尔体积=53.6×(n-1.331)。室温下棕色试剂瓶中储存。

注意：TMAC 有毒，使用时应小心。

TMAC 杂化溶液（单元 9.2）

√6ml TMAC 溶液（终浓度约 3mol/L）
√20μl 0.5mol/L EDTA（终浓度 1mmol/L）
1ml 0.1mol/L Na_3PO_4，pH6.8（终浓度 10mmol/L）
100μl 10%（m/V）SDS（终浓度 0.1%）
√1ml 50×Denhardt 溶液（5×）
40μl 10mg/ml 酵母 RNA（终浓度 40μg/mg）
1.84ml H_2O

TMAC 洗涤液（单元 9.2）

√600ml TMAC 溶液（终浓度约 3mol/L）
√2ml 0.5mol/L EDTA（终浓度 1mmol/L）
100ml 0.1mol/L Na_3PO_4，pH6.8（终浓度 10mmol/L）
10ml10%（m/V）SDS（终浓度 0.1%）
288ml H_2O

TNE 缓冲液，10×（单元 10.4）

12.1g Tris 碱（终浓度 100mmol/L）
3.7g Na_2EDTA（终浓度 10mmol/L）
58.4g NaCl（终浓度 1mol/L）
加水至 1L
调 pH 为 7.4
用孔径为 0.2μm 过滤器过滤除菌
4℃下储存 6 个月以下

TNE 缓冲液（附录 3D）

100mmol/L Tris 碱
√10mmol/L EDTA
2.0mol/L NaCl
调 pH 至 7.4，加水稀释至合适的 HCl 浓度

转染培养基（单元 13.4）

√100ml BBMM

20μl 50ng/μl 白细胞介素 3（IL-3；Biosouse International；10ng/ml）

66μl 50U/μl 白细胞介素 6（IL-3；Biosouse International；50ng/ml）

100μl 50ng/μl 干细胞因子（SCF；Biosouse International；50ng/ml）

转运培养基（单元 9.3）

3mol/L NaCl

8mmol/L NaOH

室温下存放 6 个月

转化培养基（附录 3J）

单位样品：

5ml 完全 Iscove 修饰的 Dulbecco 培养基（IMDM；Sigma 公司），含 15%FBS（见配方）

1ml Epstein-Barr 病毒（EBV）株（附录 3J）

√1ml 0.2mg/ml 环孢霉素 A

每次使用前应新制

根据不同样品中细胞不同大小，配制不同的转化培养基时，适当调整培养基体积。

Tris 缓冲盐溶液，见 TBS

Tris · Cl，1mol/L

将 121g Tris 碱（羟甲基氨基甲烷）溶于 800ml 水中

调节至合适的 pH 及 HCl 浓度

混合并加入 H_2O 到 1L

在 4℃或室温储存到 6 个月

总是使用高质量的 Tris。更低质量的 Tris 当被溶解的时候能通过它的黄色外观被识别。

pH 7.4 的溶液大约需要 70ml HCl，或者需要 pH 8.0 的溶液 42ml。

重要注解：Tris 缓冲液的 pH 会随着温度明显变化，每 1℃降低 0.028 个 pH 单位。Tris 缓冲的溶液在使用时需要调整到适当的 pH。因为 Tris 的 pK_a 是 8.08，所以 Tris 不应当在 pH 低于 7.2 或者高于 9.0 的时候使用。

Tris/乙酸底物缓冲液，0.1mol/L，pH 8.2（单元 4.7）

12.11g Tris 碱（终浓度 0.1mol/L）

2.89ml 冰乙酸（终浓度 0.05mol/L）

1L H_2O

调 pH 到 8.2

在 4℃储存 2～3 个月

在 20℃下使用

Tris/NaCl 清洗液缓冲液（单元 2.2）

√100mmol/L Tris · Cl，pH 7.5
150mmol/L NaCl
0.05%（V/V）Tween 20
室温下储存 6 个月

胰岛素/EDTA 溶液

√无菌 HBSS（看说明）或者 0.9%（m/V）NaCl
0.25%（m/V）胰岛素
0.2%（m/V）EDTA
在−20℃储存不超过一年
特殊的需要可能要求不同浓度的胰岛素，按照需要调整合适的浓度。

胰岛素/EDTA 溶液在各个浓度下都是可用的，包括 10×、1×、0.25%（m/V）。从制造商处买到的冰冻样品，能够被融化并无菌地分装到各个小容器里。从粉末原料准备胰岛素/EDTA 可能会减少开支；尽管许多实验室以溶液的形式保存。

胰岛素/EDTA/HBSS 溶液（单元 8.1）

加 10ml 0.065%（V/V）胰岛素/EDTA 溶液（看说明）到 70ml Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 HBSS（看说明）。储存 20ml 在 4℃ 10～14d。

胰岛素抑制剂缓冲液（单元 13.5）

准备 1mg/ml 的胰岛素抑制剂（Type I-S，来源于大豆；Sigma）于 Ham's F-12 培养基中（Life Technologies）。在 0.2μm 过滤器过滤并分装储存在−20℃，6 个月以上。

胰岛素溶液（单元 4.3）

将 1.25g 粉末的胰岛素（Sigma）溶解在 200ml 水中并摇动 6～8h 使其溶解。分装成 2ml 并在−20℃冻存。在使用时，在染色缸加入 2ml 和 48ml 的磷酸氢二钠缓冲液，当天准备。

胰岛素溶液 0.0125%（m/V）（单元 4.2）

加 1.0ml 的 2.5%（m/V）胰岛素（Sigma）和 99ml 去离子水（0.025%）。按和水 1∶1（V/V）的比例稀释，在 0℃储存 2 个月。

胰岛素/Giemsa 溶液（单元 4.2）

1.0ml Gurr's Improved Giemsa R66（Bio/medical Specialties）
45ml Gurr's Phosphate 缓冲液，pH 6.8（Bio/medical Specialties）
√4 滴（从 Pasteur 管中）0.0125%（m/V）胰岛素溶液
用时配制

肿瘤转运液（单元 10.2）

√100ml HBSS
5μg/ml 两性霉素
1%（V/V）青霉素/链霉素溶液（Life Technologies）
按 5～10ml 的量分装到 50ml 的离心管中
室温下储存不超过 2 个月
50ml 的离心管利于肿瘤标本的收集。

Ussing 的盒式培养基（单元 13.5）

49%（V/V）DMEM
49%（V/V）Ham's F-12 营养混合物（Life Technologies）
2%（V/V）Ultraser G（Sepracor）
在 4℃储存 2 周

清洗缓冲液，0.66×SCC（单元 11.2）

√3ml 20×SCC
√997ml DEPC 处理过的水
在孔径 0.5μm 的过滤器中过滤
室温下储存 2 个月

清洗缓冲液，0.5×SCC/0.01%（V/V）SDS（单元 11.2）

√25ml 20×SCC
√974ml DEPC 处理过的水
在孔径 0.5μm 的过滤器中过滤
√加 1ml 10% SDS 和混合液
室温下储存 2 个月

well-to-read 丙烯酰胺凝胶，6%（m/V）（单元 2.3）

在附录 3F 关于凝胶的准备中，每 24cm 的凝胶，加 50g 尿素和 15ml 的 40% 丙烯酰胺溶液到 28ml 水中。低热直到成分溶解。加 0.66g Amberlite［离子交换树脂商品名］去离子并摇动 5min。真空过滤器过滤 10ml 的 10×TBE 电泳缓冲液，然后在缓冲液中过滤去离子的尿素/丙烯酰胺溶液，给溶液排气。装配玻璃板。每块凝胶加 250μl 的过硫酸铵和 28μl 的 TEMED 开始聚合。进行 2h 直到凝胶完全聚合。

全细胞裂解缓冲液（单元 13.4）

50mmol/L KCl
√10mmol/L Tris · Cl，pH8.3
1.5mmol/L $MgCl_2$

0.1mg/ml 明胶

0.45%（V/V）Igepal CA-630（Sigma）

0.45（m/V）Tween 20（polyethoxysorbitan）

1ml 分装于−20℃保存约几年

瑞氏染色（单元 4.3）

溶解 0.3g 瑞氏染色在 100% 100ml 的甲醇中。室温下搅拌或过夜。静止 1～2h 用 Whatman no.1 滤纸过滤，装入深色瓶中。室温下储存 1 个月。使用时在 5%（V/V）氢缓冲工作液中 1∶4 稀释。溶液仍然温暖时立即使用。

Xgal staining 溶液（单元 12.6 和单元 12.8）

√PBS，pH7.4 含：

20mmol/L $K_3Fe(CN)_6$

20mmol/L $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$

√2mmol/L $MgCl_2$

过滤消毒 4℃下保存超过 1 年

使用前，均衡溶液到 37℃并且加 20μl/ml 的 50mg/ml 的 5-bromo-4-chloro-3-indoly-β-D-galactopyranoside（Xgal）在二甲基亚砜中，Xgal 溶液可 1ml 分装于−20℃黑暗保存很多年。

Xgal staining 溶液，0.1%（m/V）（单元 12.7）

溶解 2mg 5-bromo-4-chloro-3indoly-β-D-galactopyranoside（Xgal）于 250μl 二甲基甲酰胺或者二甲基亚砜中。混合 1.6ml 的水和 150μl 的 1mol/L Tris・Cl，pH8.0（见配方，终浓度 0.075mol/L）[含 10.5mg 亚铁氰化钾（终浓度 12mmol/L）和 8.8mg 亚铁氰化钾（终浓度 13mmol/L）]。用时混合两种溶液。保证溶液新鲜。

酵母 tRNA，4mg/ml（单元 11.2）

使 10mg/ml 酵母 tRNA 悬浮在装有 EDPC 处理水的一个 1.5ml 的聚丙烯圆锥形离心管中。加上 0.5 倍体积缓冲苯酚混合，再加上 0.5 倍体积氯仿混合，10 000g 离心 5min。转移水溶液层到一个新的 1.5ml 管子中并且用 1 倍体积的氯仿提取两次。转移水溶液层到一个新的 1.5ml 管子中。加 0.1 倍体积的 3mol/L 氯化钠，pH 5.2（见配方）。加 2 倍体积 100%（V/V）乙醇，离心 5min。吸上清，再加 1 倍体积的 70%乙醇。离心 5min 吸上清，使其干燥。使其悬浮于 EDPC 处理水原溶液中。用光谱仪测 RNA 的浓度。稀释到 4mg/ml 于−20℃冰冻保存。

YPD 培养基和培养板（单元 5.1 和单元 5.3）

把 10g 酵母萃取物与 20g 蛋白胨放到 2L 的烧瓶中。加 20g 琼脂在准备好的培养皿中。加 900ml 的水蒸压灭菌 20min，加 100ml 2%（m/V）的经过过滤灭菌或蒸压灭菌的葡萄糖。对于液体培养基，分发到无菌瓶中室温保存；对于培养皿，每个平板加80～100ml 的培养基于 4℃保存。

附录 2 有用的信息和数据

附录 2A 人类重复 DNA 序列概述

本节主要描述了人类基因组中最丰富的 DNA 重复序列类型。图 A. 2A. 1 显示的是这些重复类型在人类 16 号染色体上的分布。关于这一主题的参考见附录 1B CPHG。

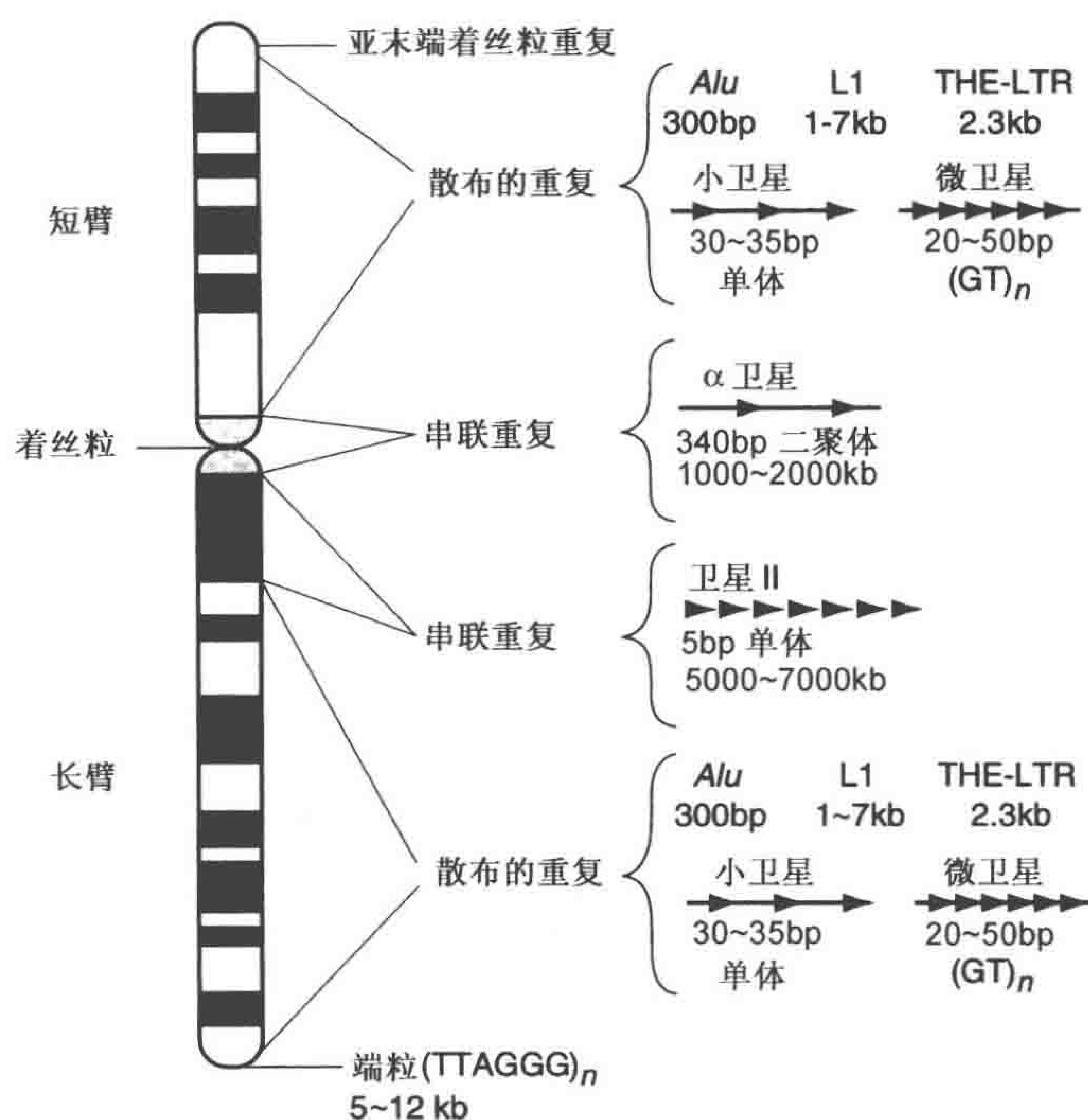


图 A. 2A. 1 主要的 DNA 重复序列类型在染色体上的排列。沿着人类 16 号染色体分布的主要的 DNA 重复序列类型。箭头间的区段长度与重复单元的大小相关。

端粒重复 线性的 DNA 分子构成了人类和其他脊椎动物的染色体，串联重复单元 (UNIT) TTAGGG 就位于这些线性 DNA 分子末端。端粒重复 $(TTAGGG)_n$ 长度为 5000～12 000bp；其结构中存在鸟嘌呤-鸟嘌呤碱基对，这与标准的 DNA 分子结构不同。端粒重复在端粒酶附近以一种独特的方式重复，后者在复制中可以防止染色体缩短。

亚末端着丝粒重复 这些亚末端着丝粒重复序列散布在邻近端粒的非重复 DNA 序列最末段的 500 000 碱基中。其中有的是染色体特异性的；其余的似乎是在接近许多或全部人类染色体的尾端出现。亚末端着丝粒 DNA 也包括其他类型的散布的重复 DNA，它们不是亚末端着丝粒特异性的。

微卫星重复 这种类型包括许多单一的二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸和五核苷酸串联重复序列（也称为单一序列重复，SSR)，它们散在分布在大多数的常染色体臂

上。其中二核苷酸（GT）$_n$ 和（CA）$_n$ 重复是最常见的重复类型，人类基因组中大约每 30 000 个碱基就会出现一次，总的拷贝数为 100 000 个。在大多数真核生物基因组中都会出现 GT 重复序列，长度大小为 20～60bp。这些微卫星序列重复的次数在人群中的个体间高度变化；结果就形成了丰富类型的简单重复序列长度多态性（SSLP）或遗传标记，应用 PCR 技术（单元 2.1）可以对这种类型的多态性进行鉴定。

小卫星重复　这是一类散在分布的串联重复，也被称为可变数串联重复（variable number tandem repeat，VNTR），其重复单元长度为 30～35bp，具体的序列是可变的，但都包含一段 10～15bp 的保守核心序列。小卫星串联重复的长度呈现高度的多态性，这使得其大小从 200 到几千碱基对不等。在基因组中每 1000 多个位点就会出现这种小卫星重复，但是它也有更多地集中出现在染色体端粒末端的趋势。许多小卫星重复的核心序列是高度保守的，这些核心序列的探针已经被用于检测高等真核生物中许多物种间的多态性。小卫星重复的高度多态性可用于以 DNA 为基础的个体身份鉴定或是 DNA 指纹分析。

Alu 重复　这是散布在人类基因组中最丰富的重复序列。Alu 序列的平均长度为 282bp，在人类基因组中平均每 3300bp 就会出现一次，总的拷贝数为 500 000～1000 000 次。因为其长度短，Alu 被归类为一种短的散布的重复序列（SINE）。因为在人类基因组中出现的高频率，同时在灵长类前的各目中缺少保守性，或是从酵母宿主中以人类序列为层面的 YAC 克隆中。Alu 重复序列成为散布重复序列 PCR（interspersed repetitive sequence PCR，IRS-PCR）技术应用的有用的目标。IRS-PCR 可以从非人类 DNA 的背景中特异扩增出人类的序列，如从人类/啮齿目动物体细胞的杂种中（单元 3.1）。

L1 重复　这种长的散布重复序列（LINE）全长有大约 7000bp。L1（也被称为 *Kpn* Ⅰ 重复）在其 3′端都具有一段共有的序列而在 5′端则具有可变的短序列，因此其大小可变，最长可达到 7000bp。在人类基因组中既有全长为大约 3500bp 的 L1，也有 100 000bp 长度的截短的拷贝。全长型的 L1（占全部 L1 重复的 3.5%）属于Ⅱ类反转录转座子（“跳跃基因”）的一个分支，可以在基因组中移动，它被认为是反转录病毒的剩余。Ⅱ类反转录转座子不包含长末端重复序列，但至少含有一个可读框同时还有一个 poly（A）尾。已经发现的一种全长型功能性的 L1 重复编码一种有功能的反转录酶，这种酶在 L1 的复制和再插入基因组的过程中是必需的。以 L1 重复序列模板所设计的引物也已经被证明可用于散布重复序列 PCR（IRS-PCR）中。

THE-LTR 重复　这是一类散在分布的重复成分的超家族，在哺乳动物基因组中其数量为 40 000～100 000 个。这类超家族包括一些 MER 元件（见后述），这些 MER 元件已被证明是从一种祖先型 THE1 元件的部分衍生而来。THE-LTR 重复是一些反转录转座子样的元件，有一段长 1600bp 的内部序列两侧为长末端重复（long terminal repeat，LTR；大小为 350～600bp）。内部序列含有一个长的可读框，在转录中通常被截短或剪切。

MER 重复　mer 重复序列是一些中等重复频率重复序列的家族（在每个单倍体基因组上的拷贝数从 200～10 000）。迄今为止已证实的 MER 家族超过 30 个。这些重复家族的起源未知，大小可变。它们被推测为人类基因组形成的进化过程提供了“化石样的记录”。

α 卫星 DNA　这些序列是在人类全部染色体的着丝粒区呈长的串联排列的相关序列

家族。重复单元是一个 340bp 大小的二聚体，由一个 169bp 和 171bp 的单体构成，两个单体的相似性为 73%。α 卫星 DNA（也称为 alphoid DNA）位于着丝粒缢痕两侧，延伸到 1000～5000bp 的区域。其他灵长类的 α 卫星 DNA 与人类的 α 卫星相关。在许多人类染色体中已经证实 α 卫星的亚家族对单个或少数的染色体而言具有特异性。从这些亚家族中发展起来的染色体特异性的着丝粒标记已成为有用的细胞遗传学标记，被应用于利用荧光原位杂交（FISH）技术来分析染色体的异常。

卫星Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ重复　这是三类经典的人类卫星 DNA 序列，由于它们的密度与其他 DNA 序列的密度不同，所以可以采用浮力-密度梯度离心的方法将其从大量的基因组 DNA 中分离出来。卫星Ⅰ序列中富含腺嘌呤和胸腺嘧啶核苷酸，并由 17bp 和 25bp 重复单元交替排列构成。卫星Ⅱ、Ⅲ都是从单一的 5 个碱基重复单元 ATTCC 衍生而来。卫星Ⅱ在基本重复单元中比卫星Ⅲ高度分支。卫星Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ呈长的串联排列，其位置在 1、9、16、17 和 Y 染色体的异染色质区域和 13、14、15、21、22 号染色体短臂的卫星区域。以这类经典的卫星重复序列为模板的染色体特异性的探针也已经被设计出来。

C_0t_1 DNA　这个重复 DNA 片段是从其他基因组 DNA 中分离出来的，因为其具有更快的退火动力学特性。C_0t_1 DNA 中包含有拷贝数为 10 000 甚至更高的序列。C_0t_1 序列已有商业化的提供，用于对 DNA 探针的预退火，从而阻止高度重复的序列与靶 DNA 的杂交。

编者：Norman A. Doggett

附录 2B　ISCN 标准核型模式图

染色体带主要用于鉴定正常和重排的染色体，确定染色体的断裂点和描述染色体上 DNA 序列的特定位置（单元 4.3 和单元 4.4）。为了标准化已鉴定出的染色体和染色体带的名称，一个命名体制已经被建立起来。这个现在正在使用的体制是国际人类细胞遗传学命名体制（1995），它包括了染色体带的命名和标准核型模式图，后者是指“对核型的图表性描述，它应以对染色体的测量为基础”（ISCN，1995）。在 S. Karger、D. Adler 和 *Cytogentics* 与 *Cell Genetics* 的许可下，这里所提供的核型模式图是有染色体带数字标记的 G 显带染色体图。异染色质区包括了不同类别的重复 DNA 序列，可以显示个体染色体大小的差异，在图中显示的是图案样的区域。它包括所有染色体的着丝粒区，1、9、19 号染色体和 Y 染色体长臂末端的大段区域和近端着丝粒染色体，即 13、14、15、21 和 22 号染色体的短臂。

图 A. 2B. 1～图 A. 2B. 24 提供的染色体核型模式图代表的是标准的人类细胞遗传学命名国际体制（ISCN，1995）高分辨染色体带，从左至右依次显示的是 400、550 和 850 条带每个单倍体基因组水平的染色体带。带的数字（从最低的着丝粒到最高的端粒）都标示在每个带的左边。着丝粒处的横线（凹陷处）将各染色体的短臂和长臂区分开来。850 条带水平的核型模式图也显示出了 G 带显色中染色体各带着色强度的差异。为了便于对这些图形进行操作（如用 Adobe Illustrator 或其他相应的程序）生成重排染色体的图，网址 http：//www. pathology. washington. edu/cytopages 提供了这些核型模式图的数字化格式。图 A. 2B. 25 显示的就是进行这种操作的一个范例。

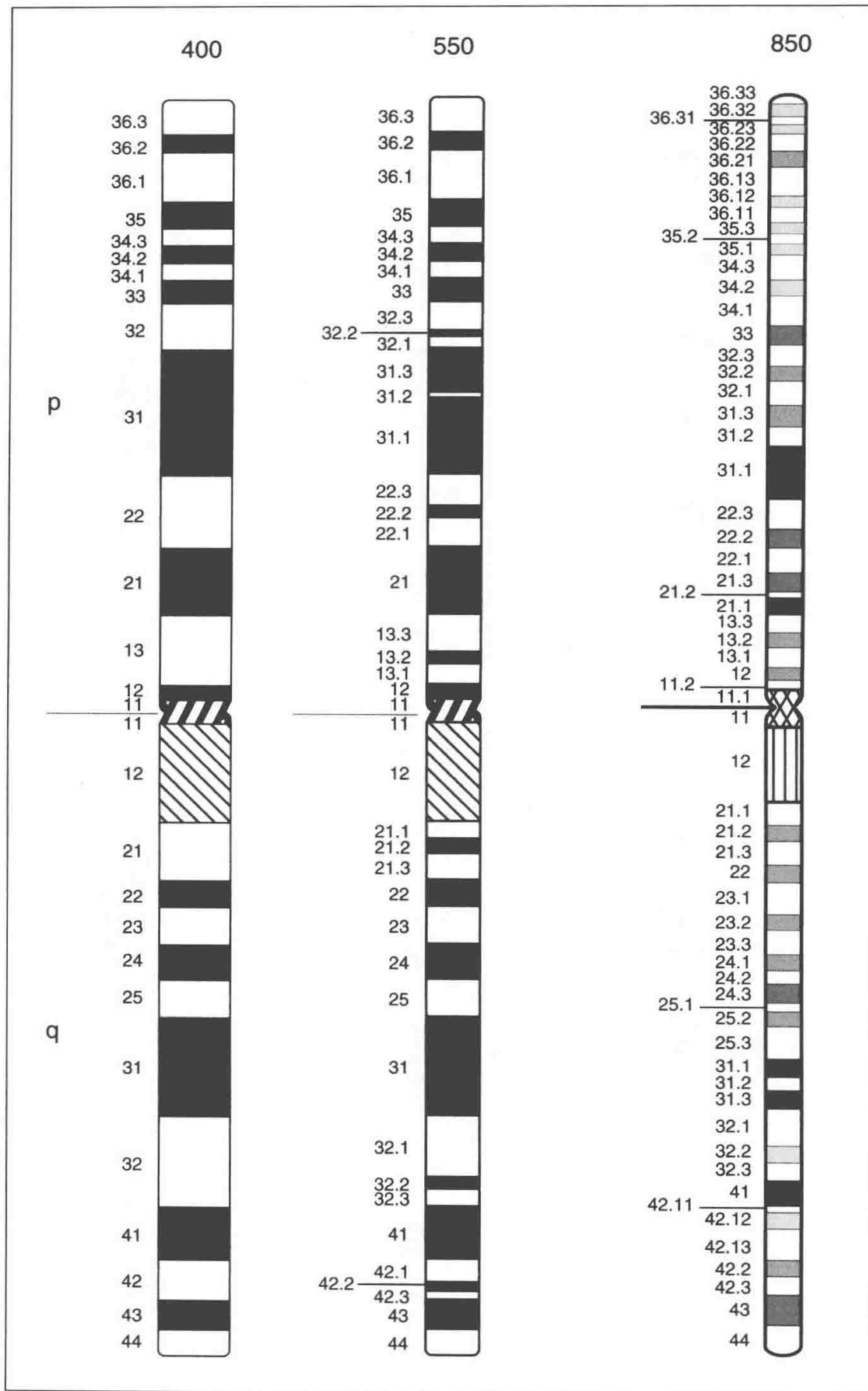


图 A. 2B. 1　1 号染色体核型模式图。在所有核型模式图中，400 条带和 550 条带水平是根据国际人类细胞遗传学命名体制（ISCN，1981）命名的；带的位置和宽度没有依据测量。850 条带的核型模式图代替了 ISCN（1981）的版本，带的数字与后者相同，但是常染色质带的相对宽度是根据吉姆萨胰蛋白酶带染色的强度测定的（Francke，1981）。

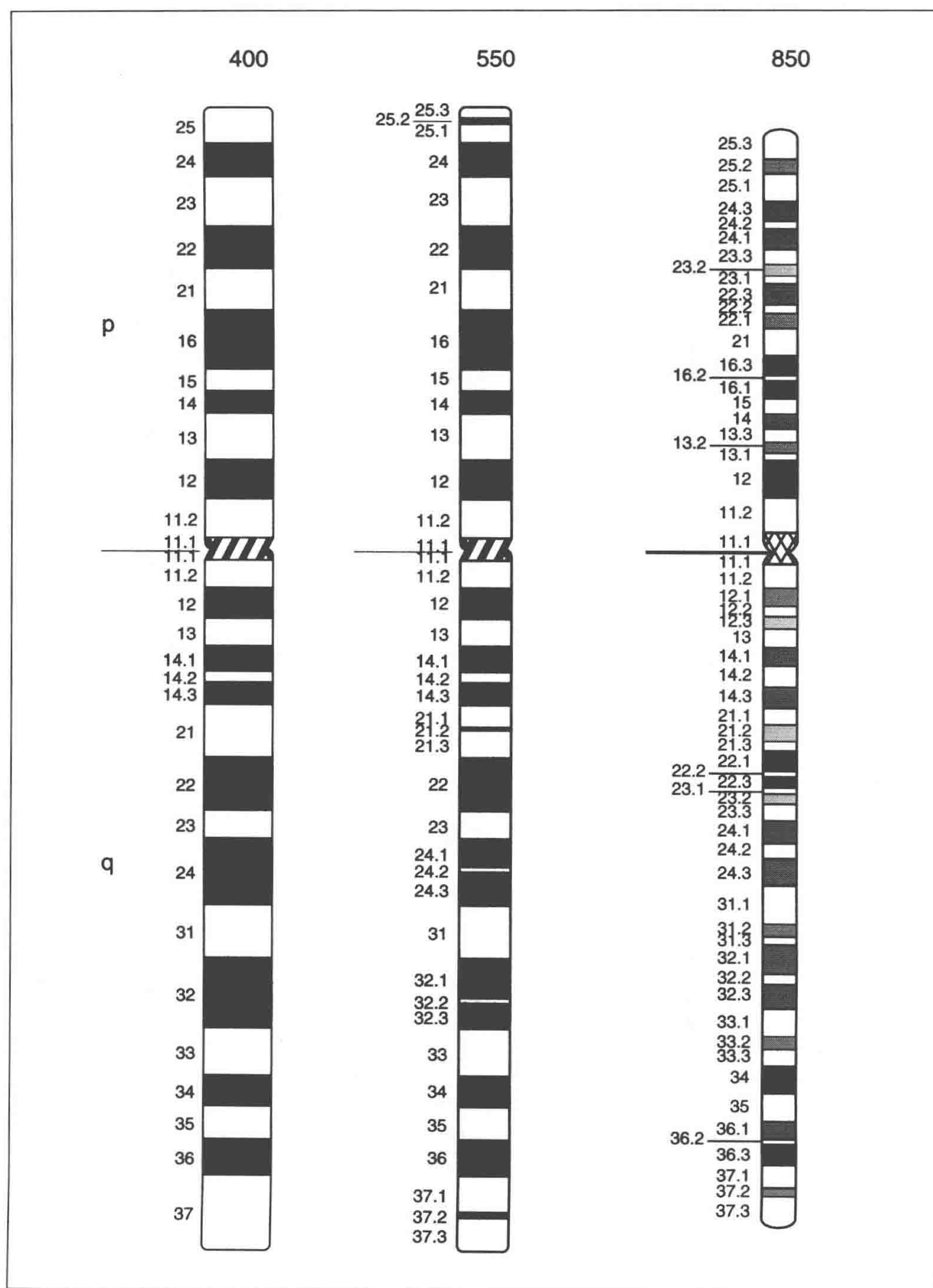


图 A. 2B. 2　2 号染色体核型模式图。

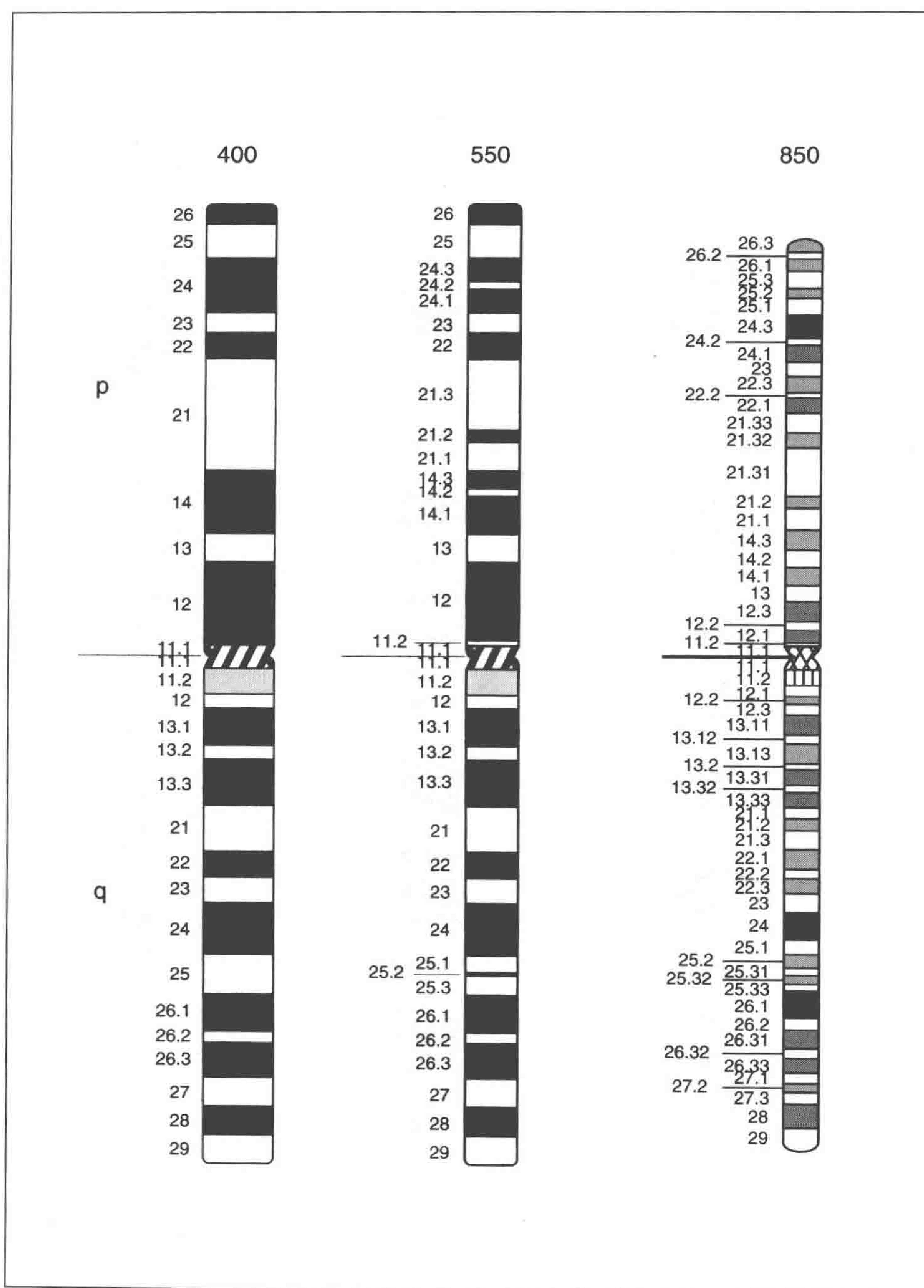


图 A. 2B. 3　3 号染色体核型模式图。

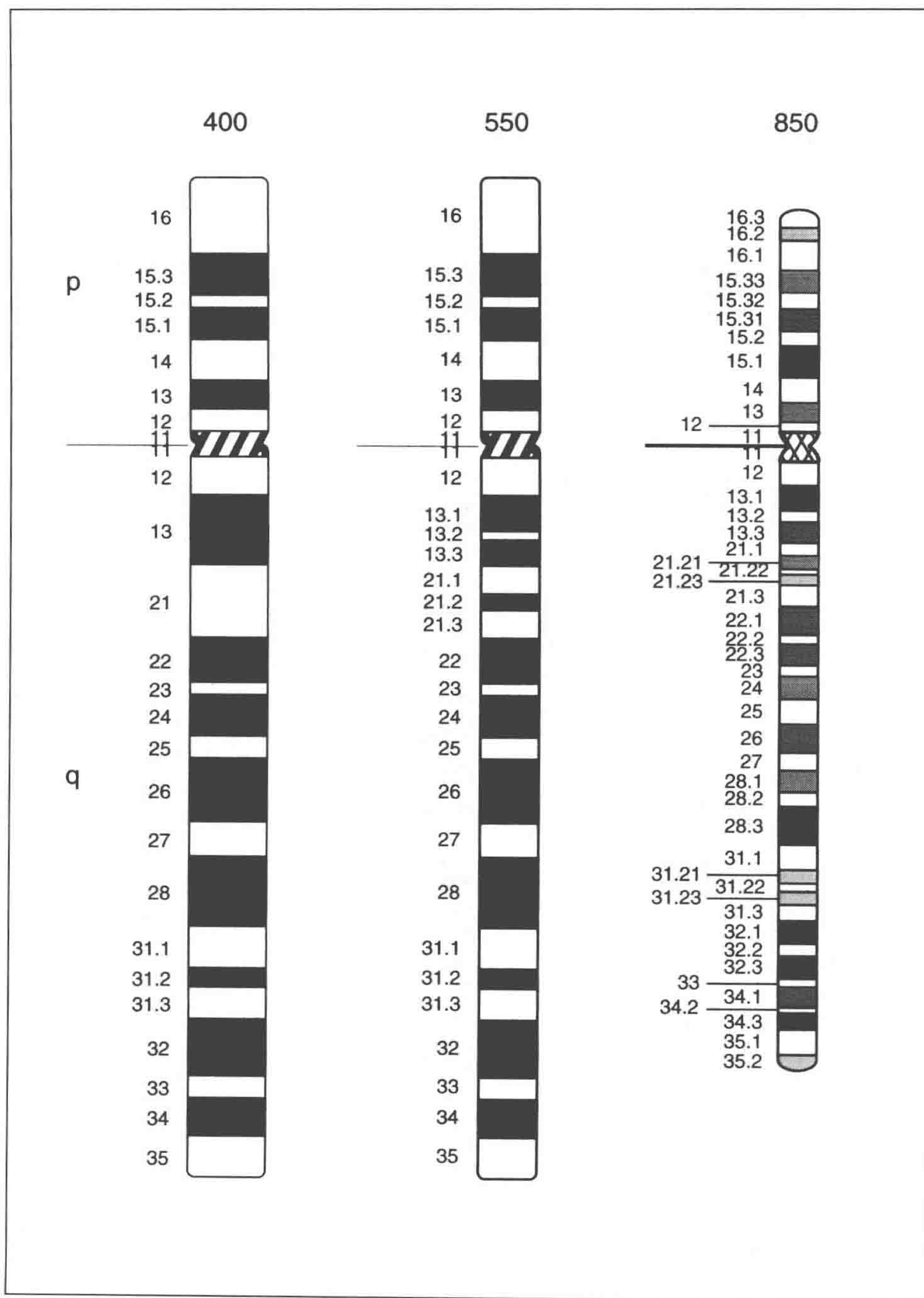


图 A. 2B. 4　4 号染色体核型模式图。

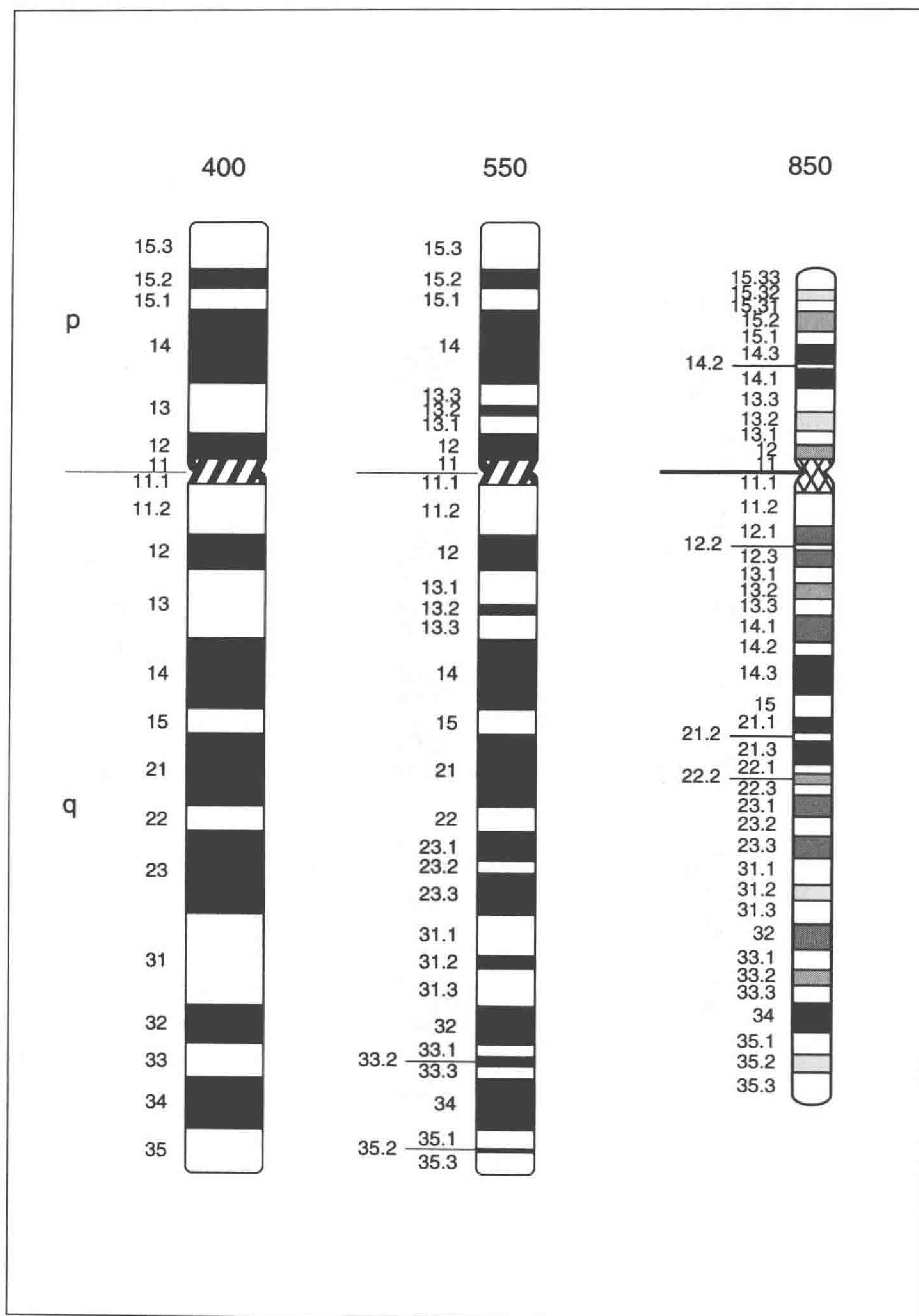


图 A. 2B. 5　5 号染色体核型模式图。

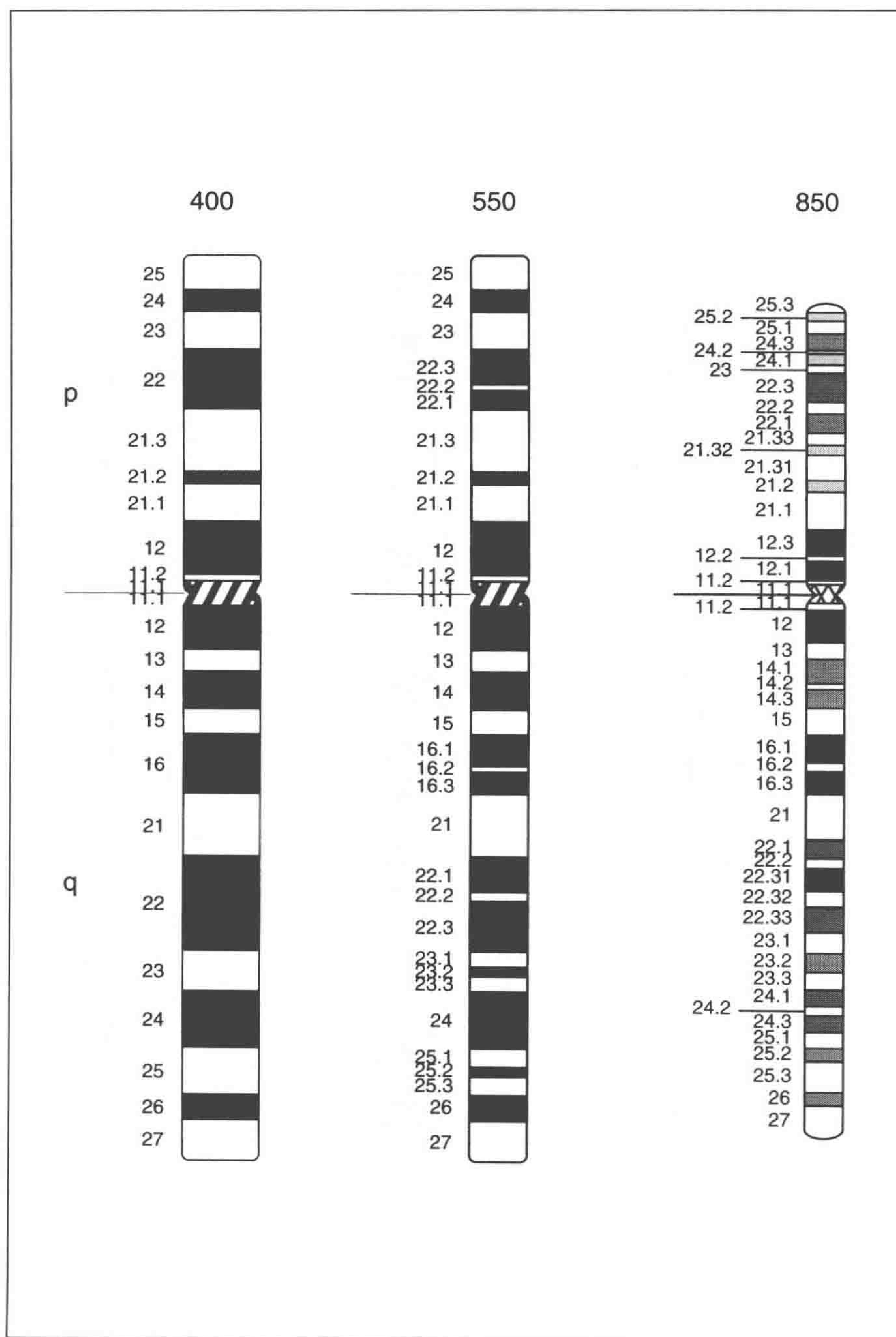


图 A. 2B. 6　6 号染色体核型模式图。

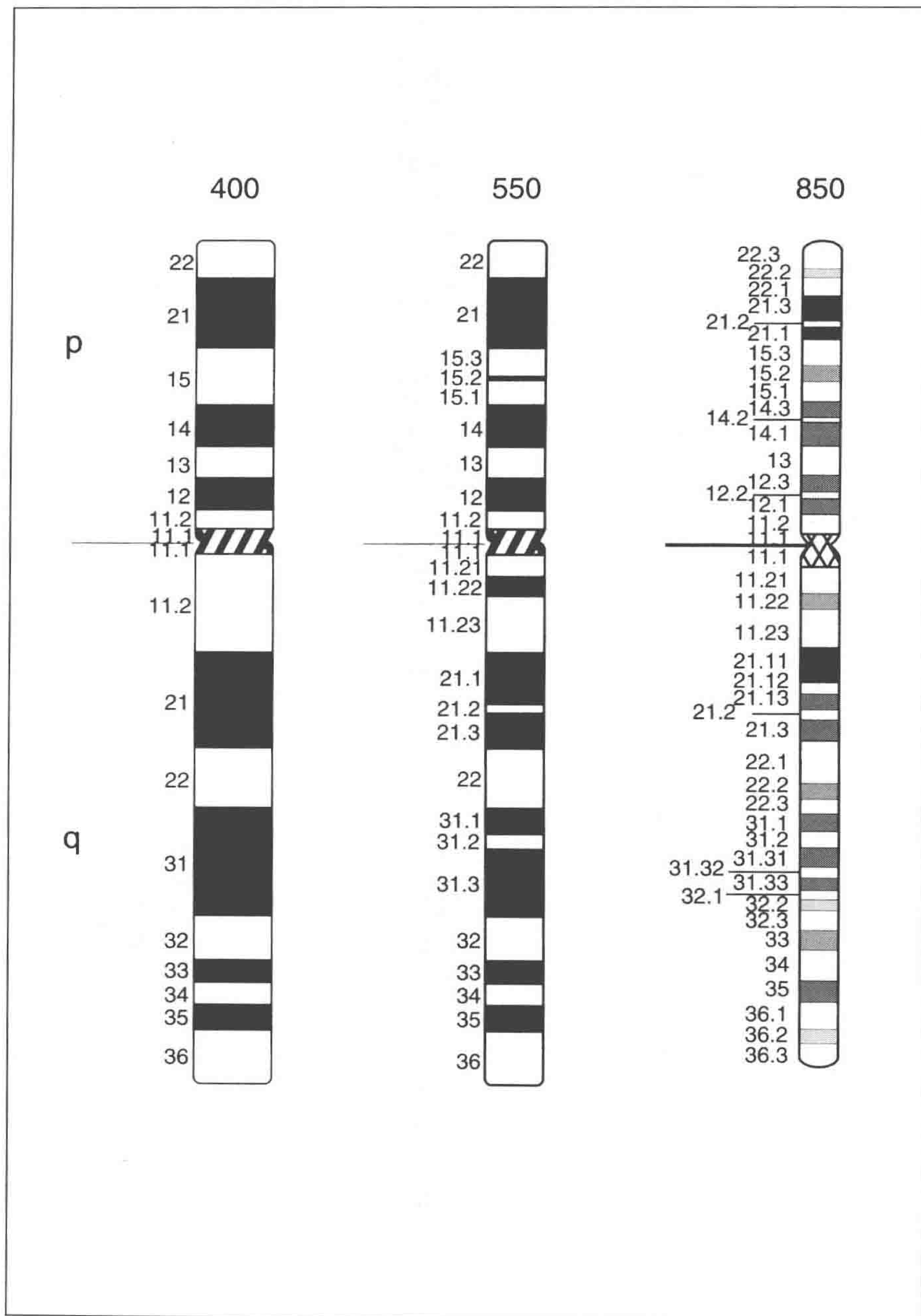


图 A. 2B. 7 7 号染色体核型模式图。

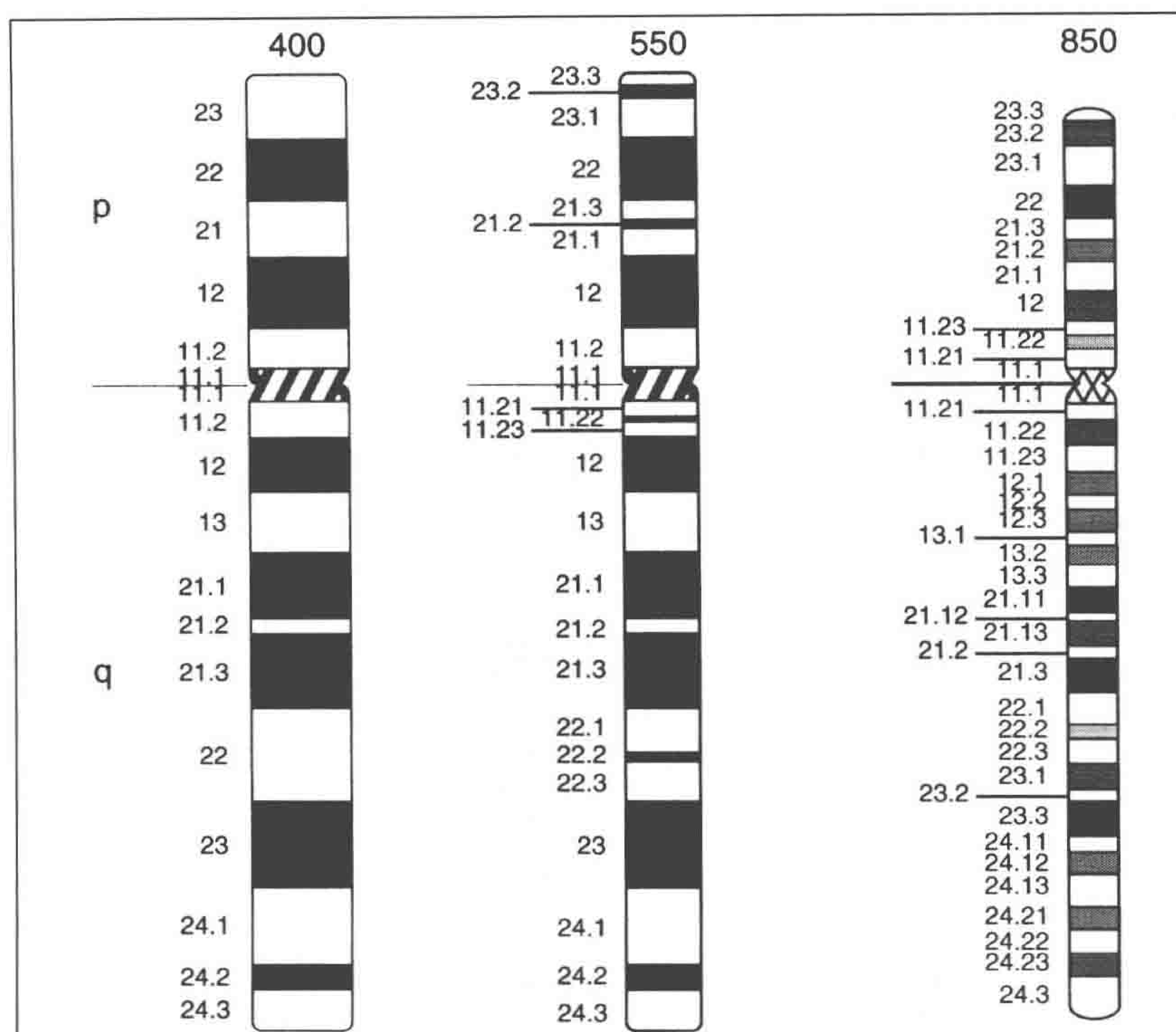


图 A. 2B. 8　8 号染色体核型模式图。

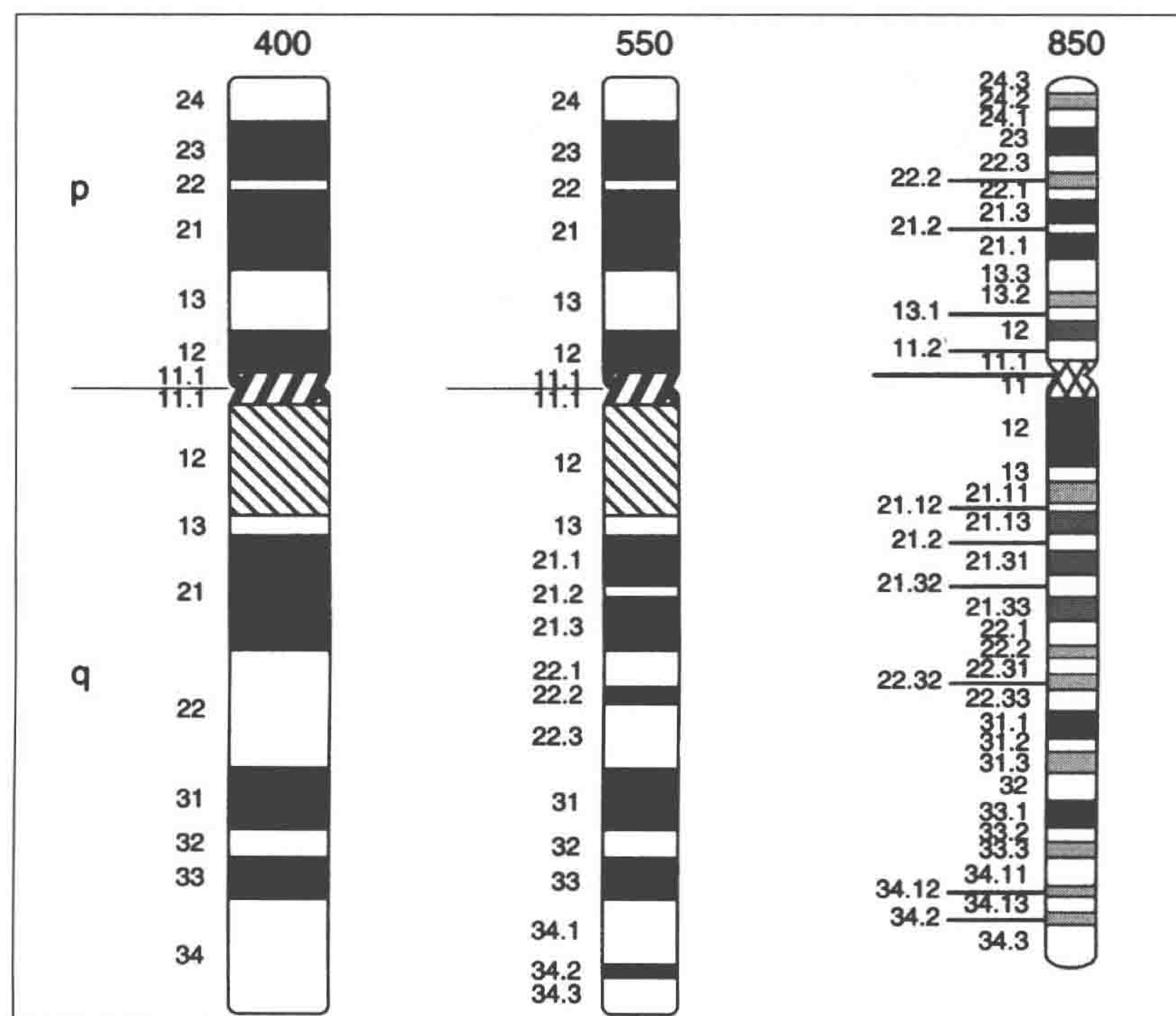


图 A. 2B. 9　9 号染色体核型模式图。

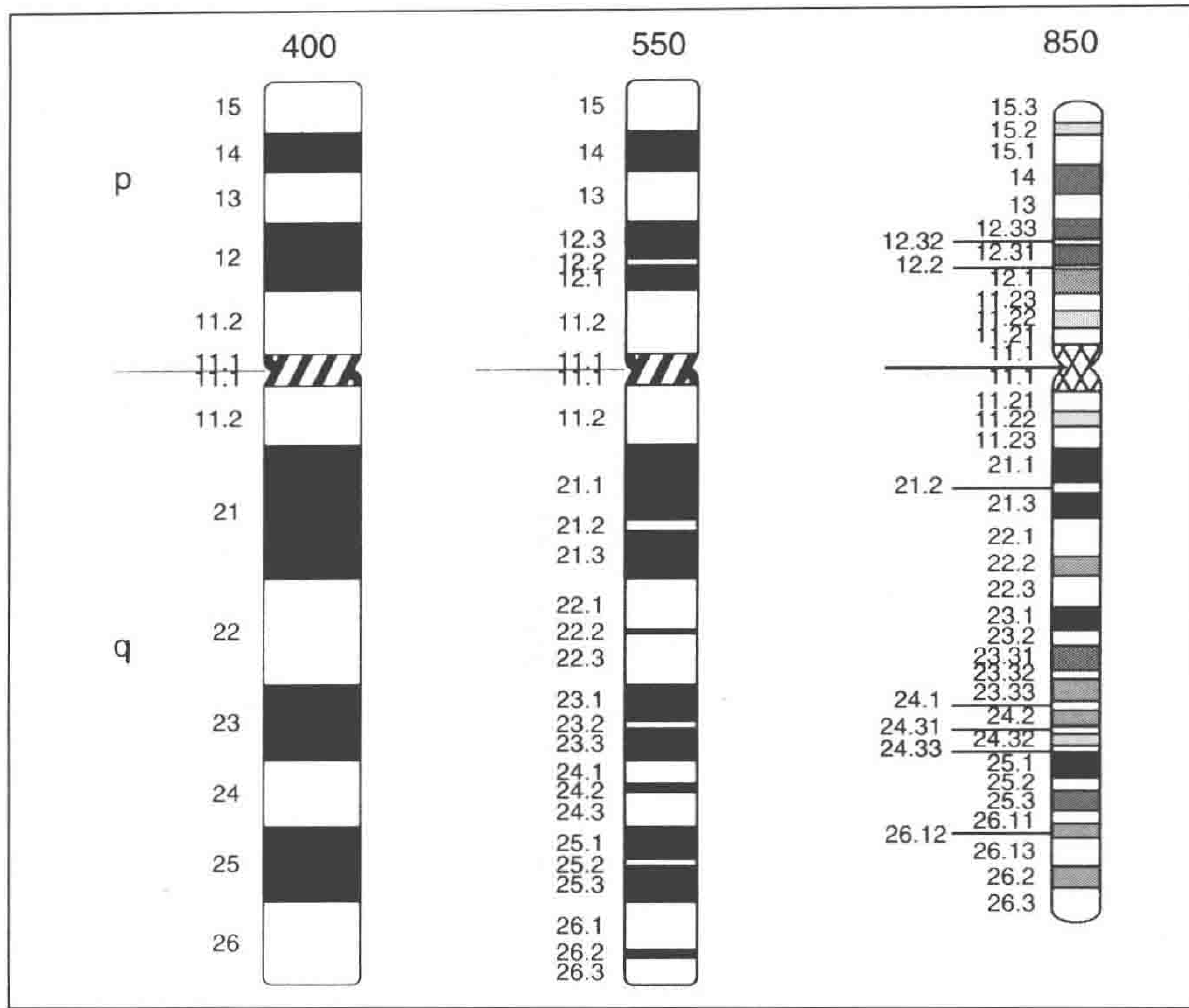


图 A. 2B. 10 10 号染色体核型模式图。

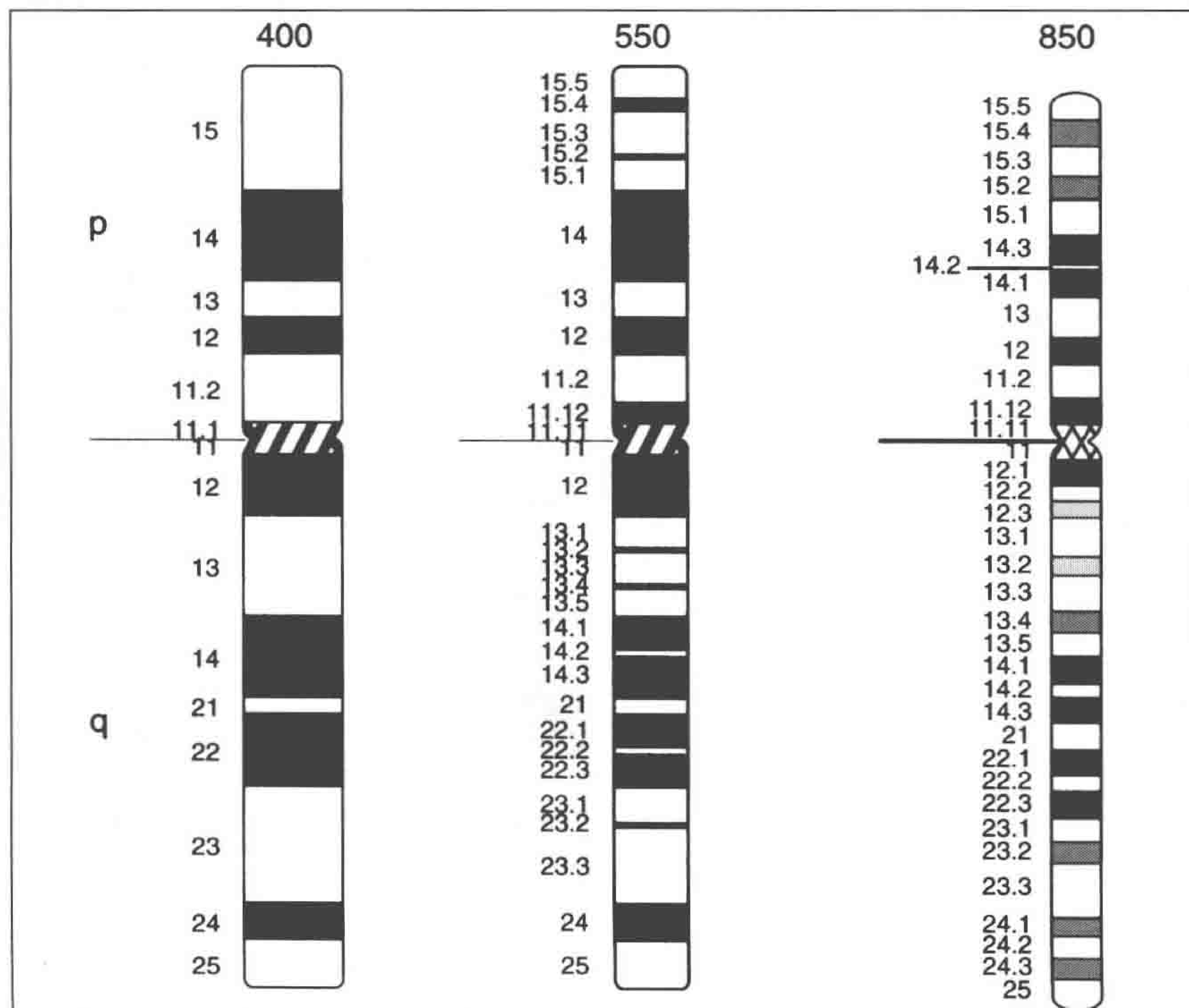


图 A. 2B. 11 11 号染色体核型模式图。

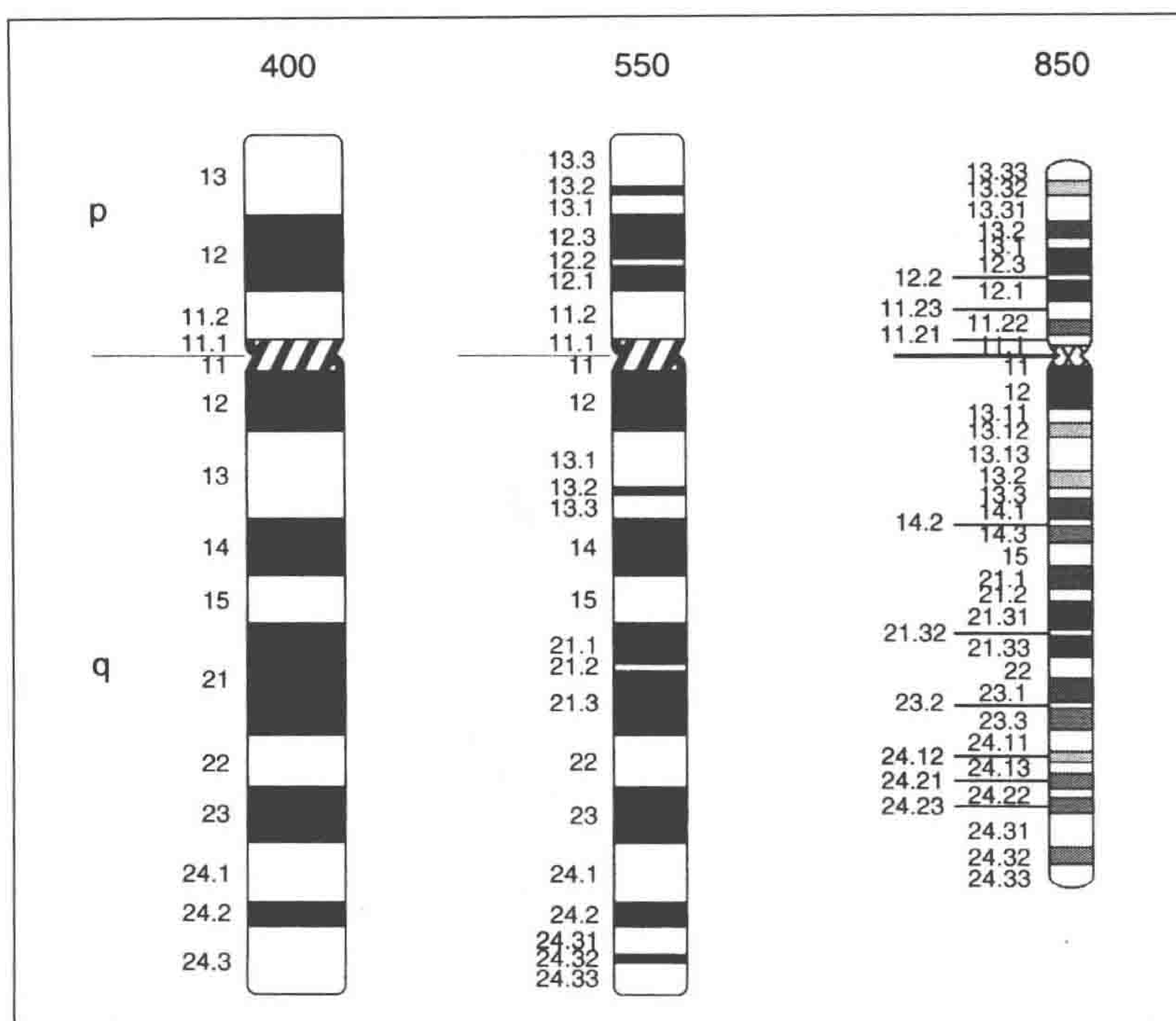


图 A. 2B. 12　12 号染色体核型模式图。

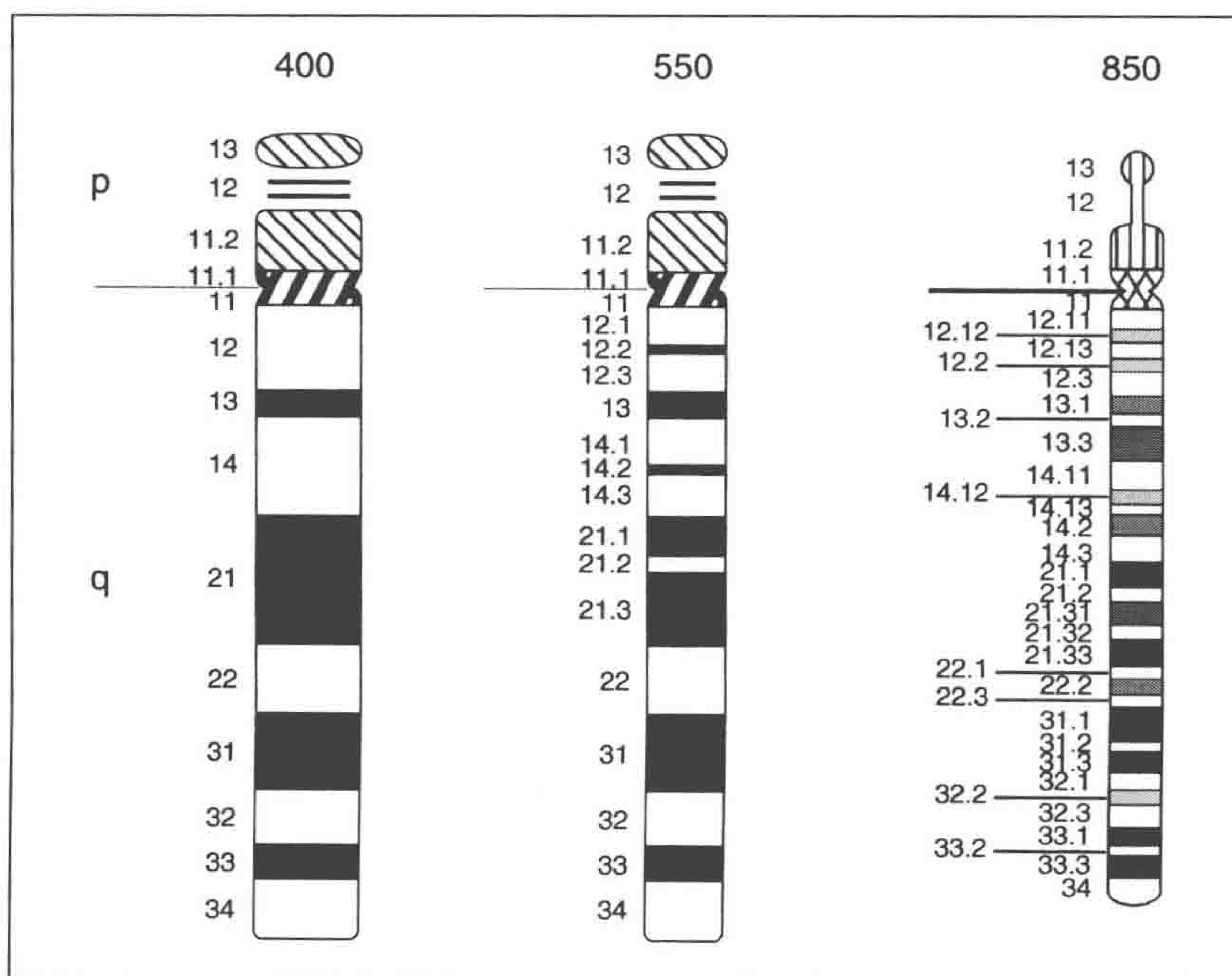


图 A. 2B. 13　13 号染色体核型模式图。

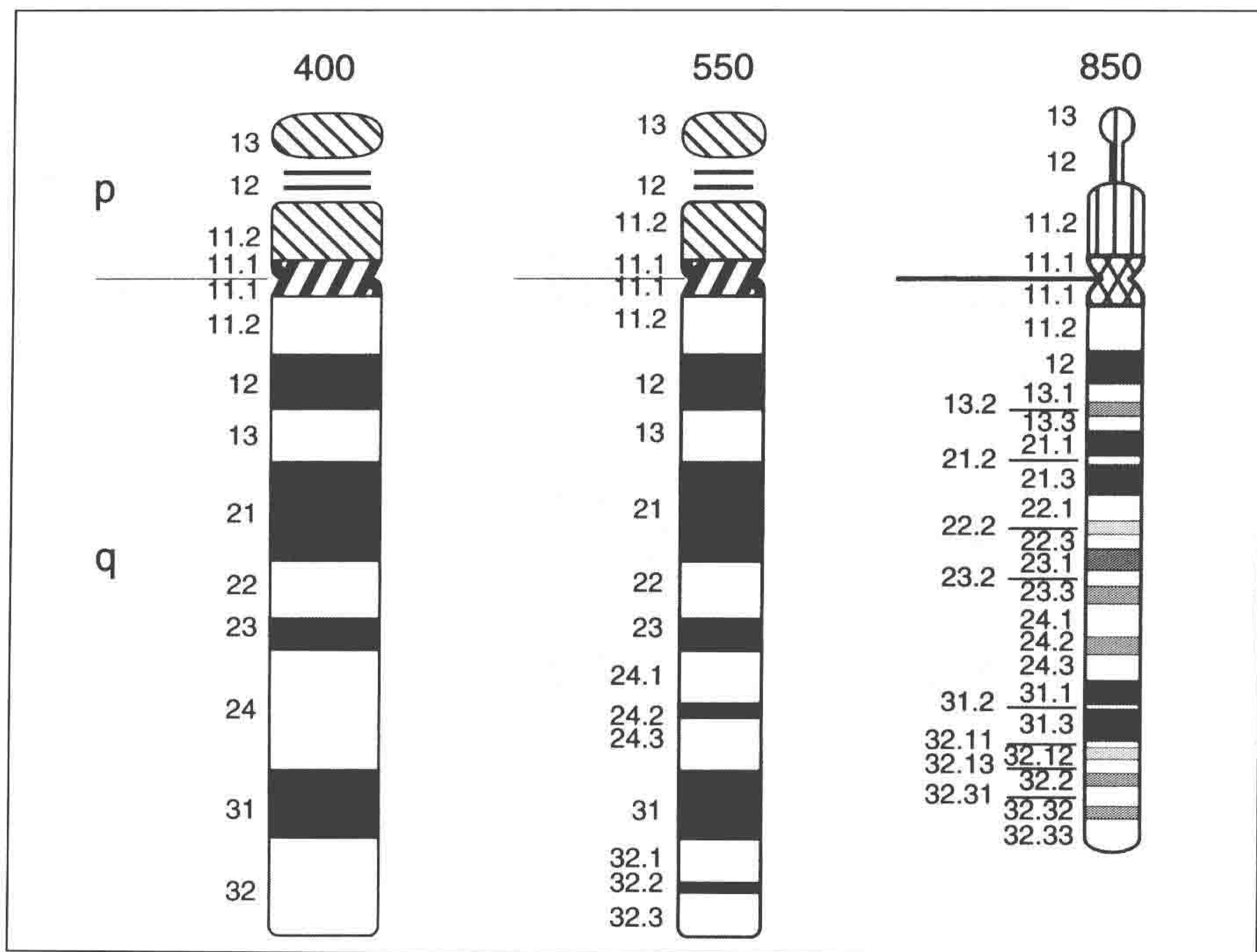


图 A. 2B. 14　14 号染色体核型模式图。

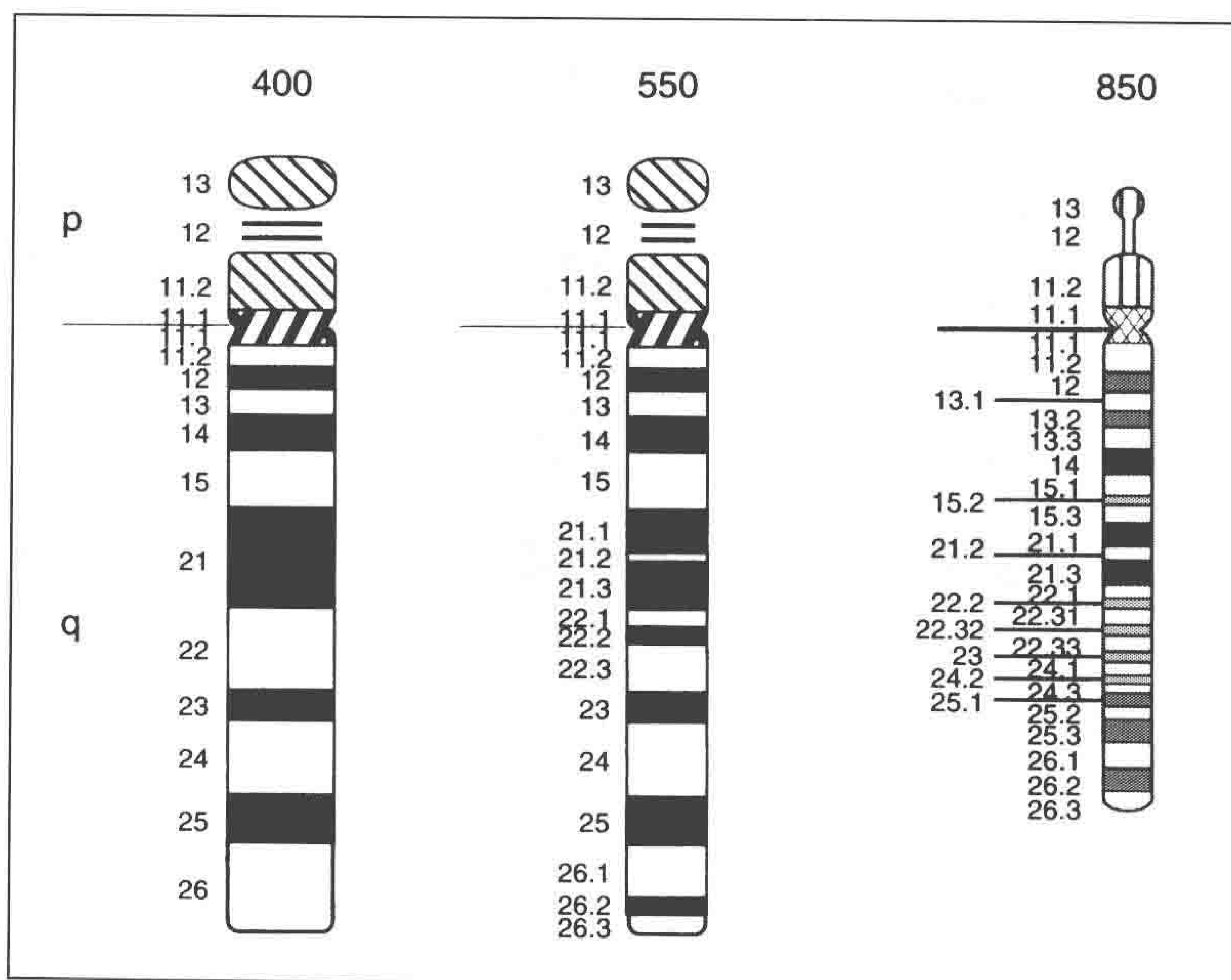


图 A. 2B. 15　15 号染色体核型模式图。

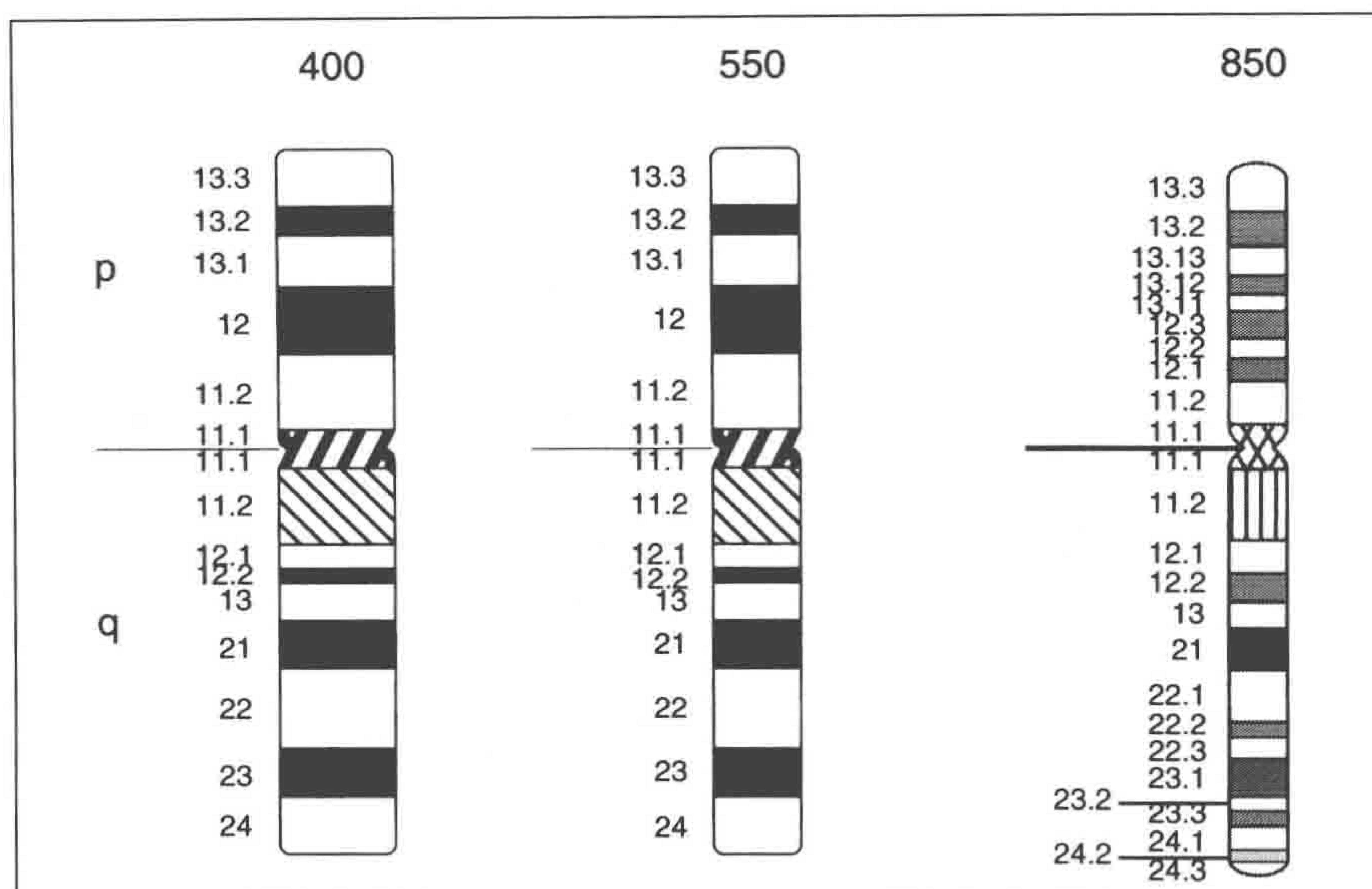


图 A. 2B. 16　16 号染色体核型模式图。

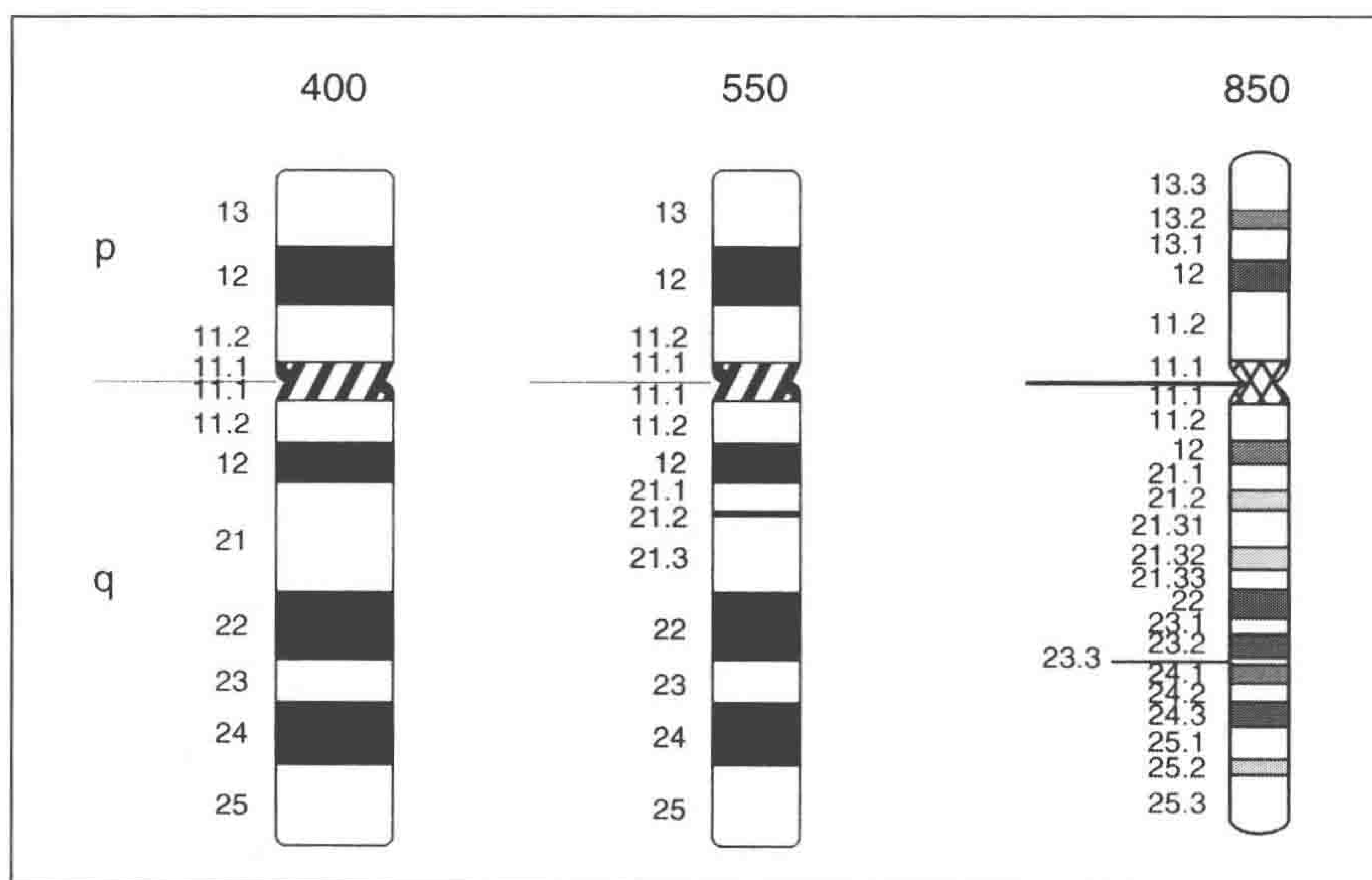


图 A. 2B. 17　17 号染色体核型模式图。

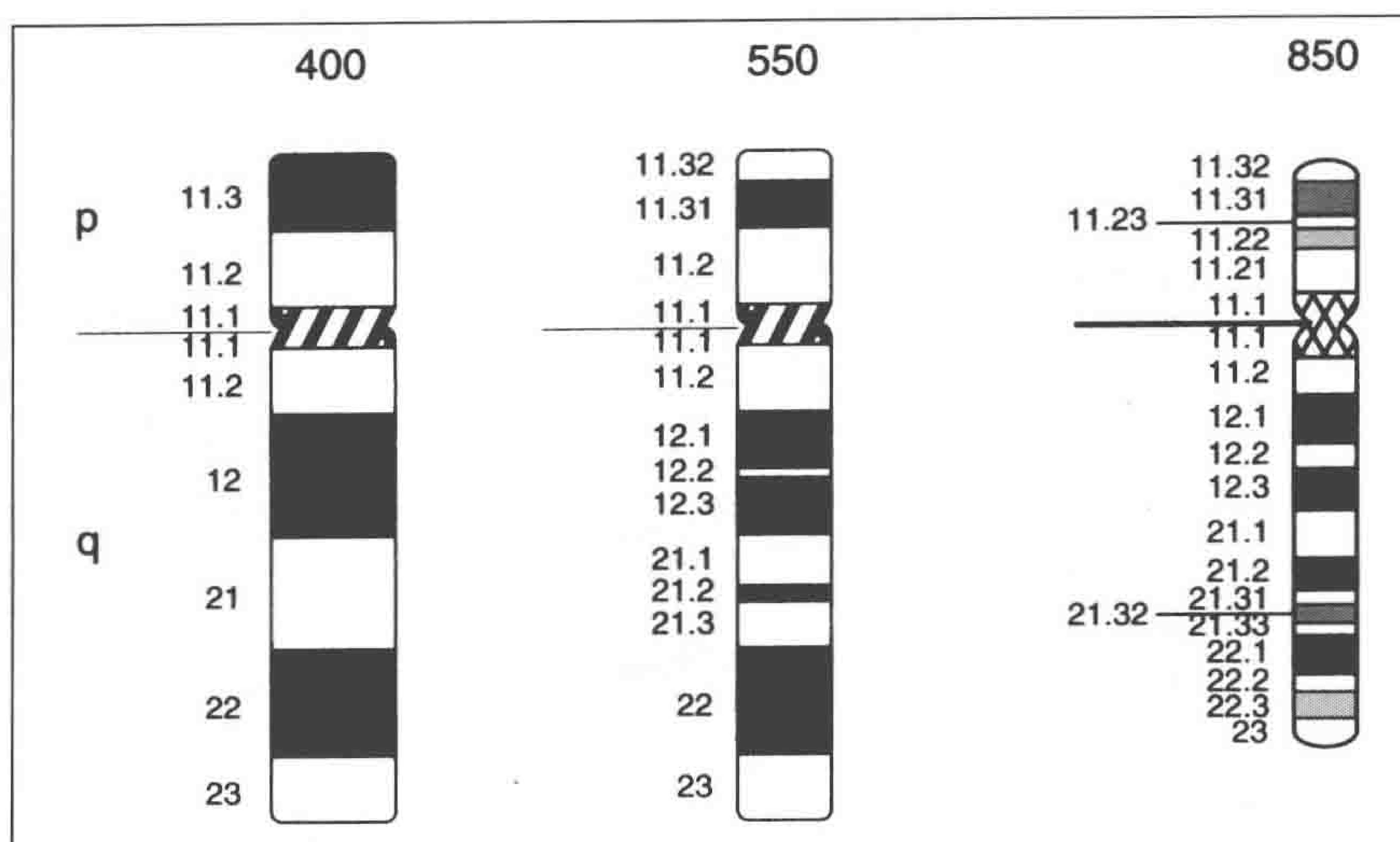


图 A. 2B. 18　18 号染色体核型模式图。

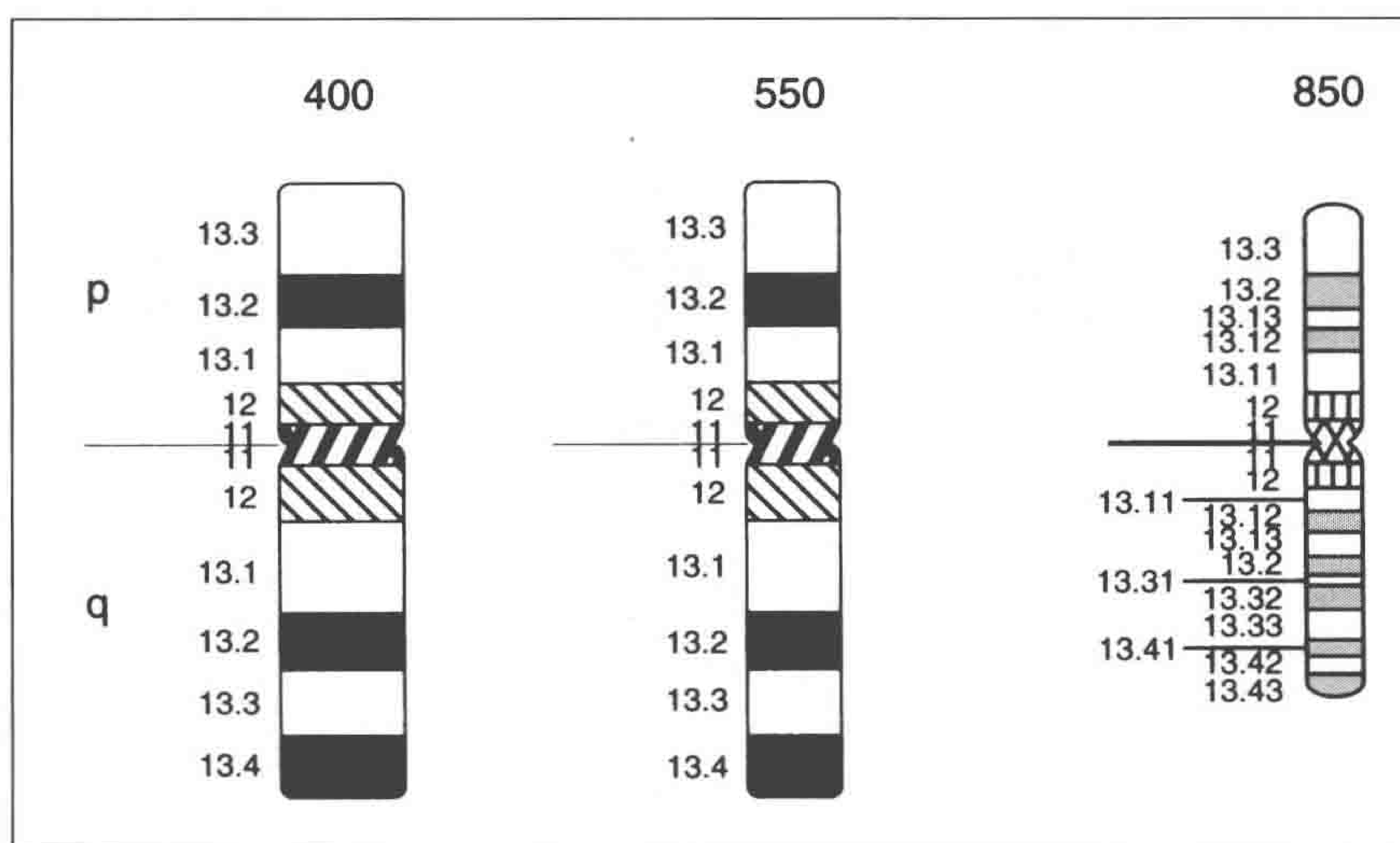


图 A. 2B. 19　19 号染色体核型模式图。

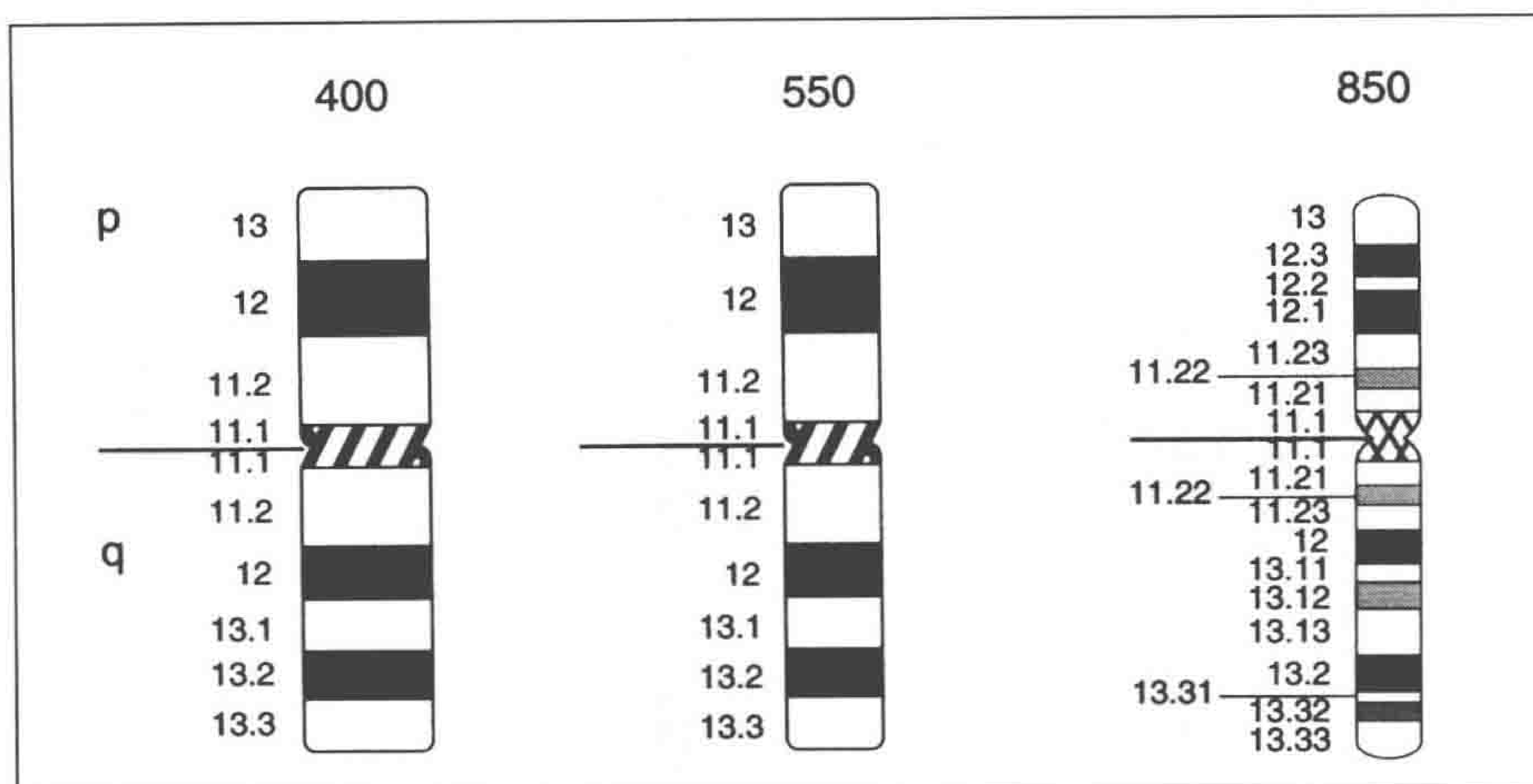


图 A. 2B. 20　20 号染色体核型模式图。

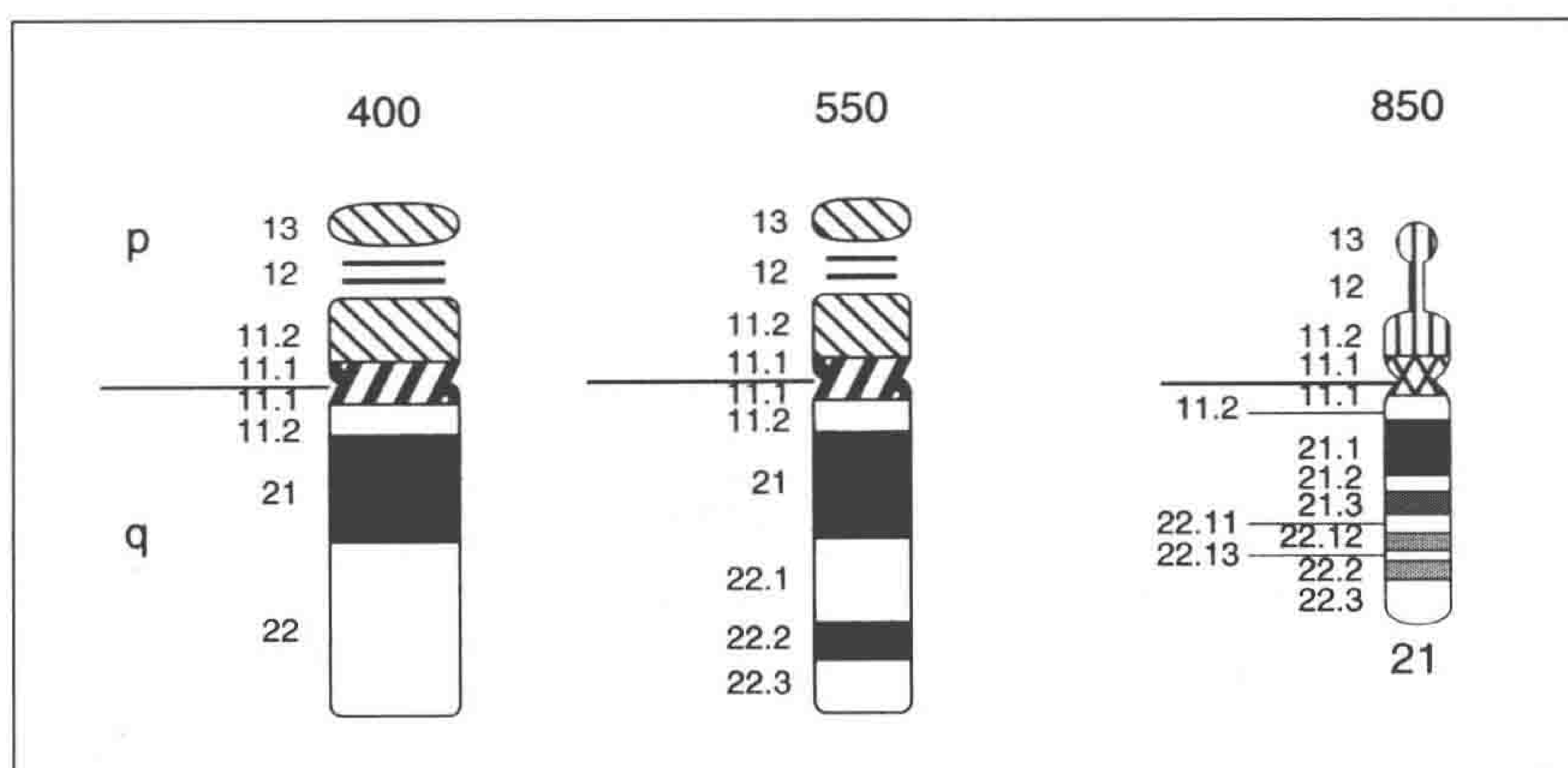


图 A. 2B. 21　21 号染色体核型模式图。

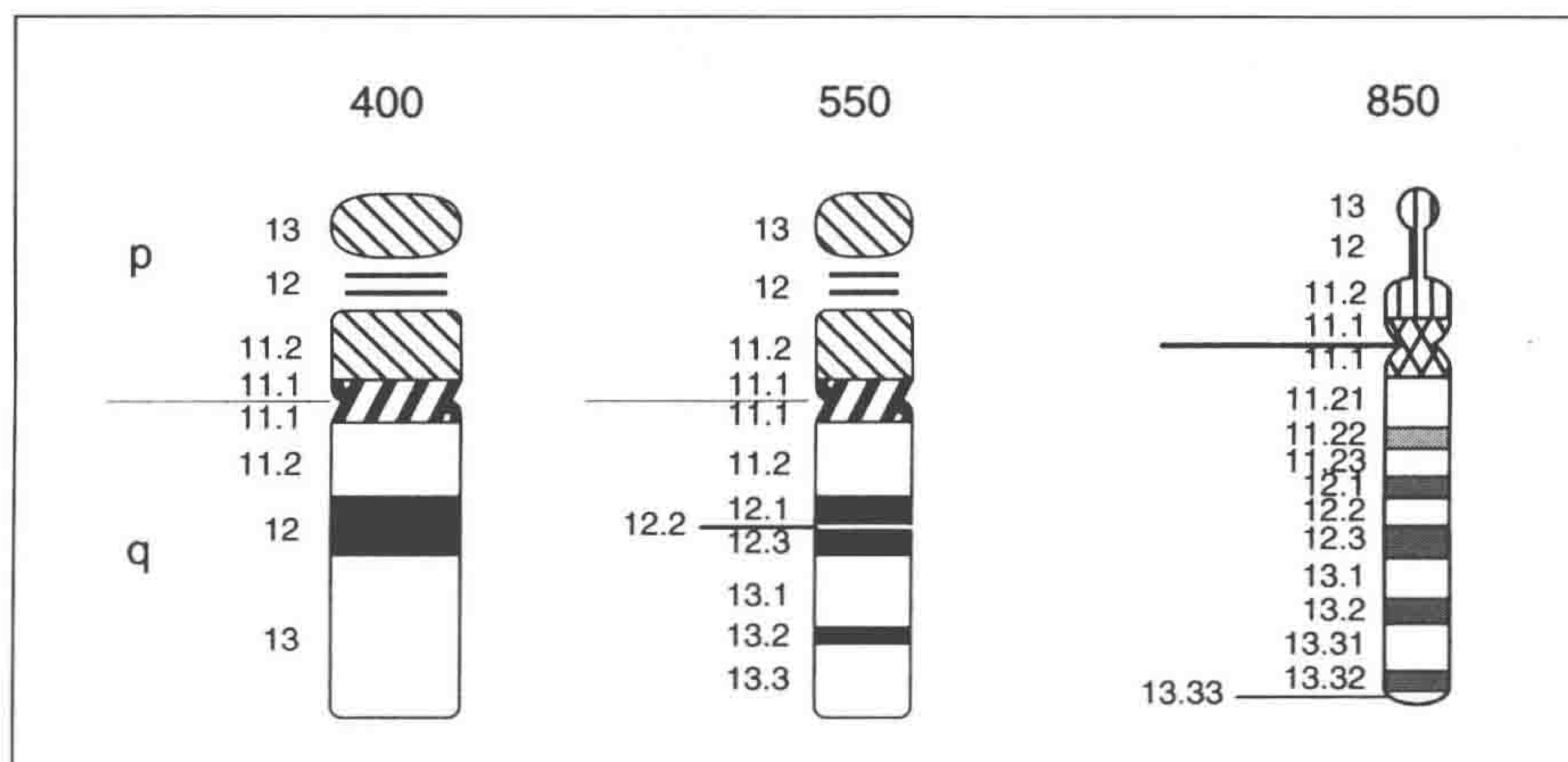


图 A. 2B. 22　22 号染色体核型模式图。

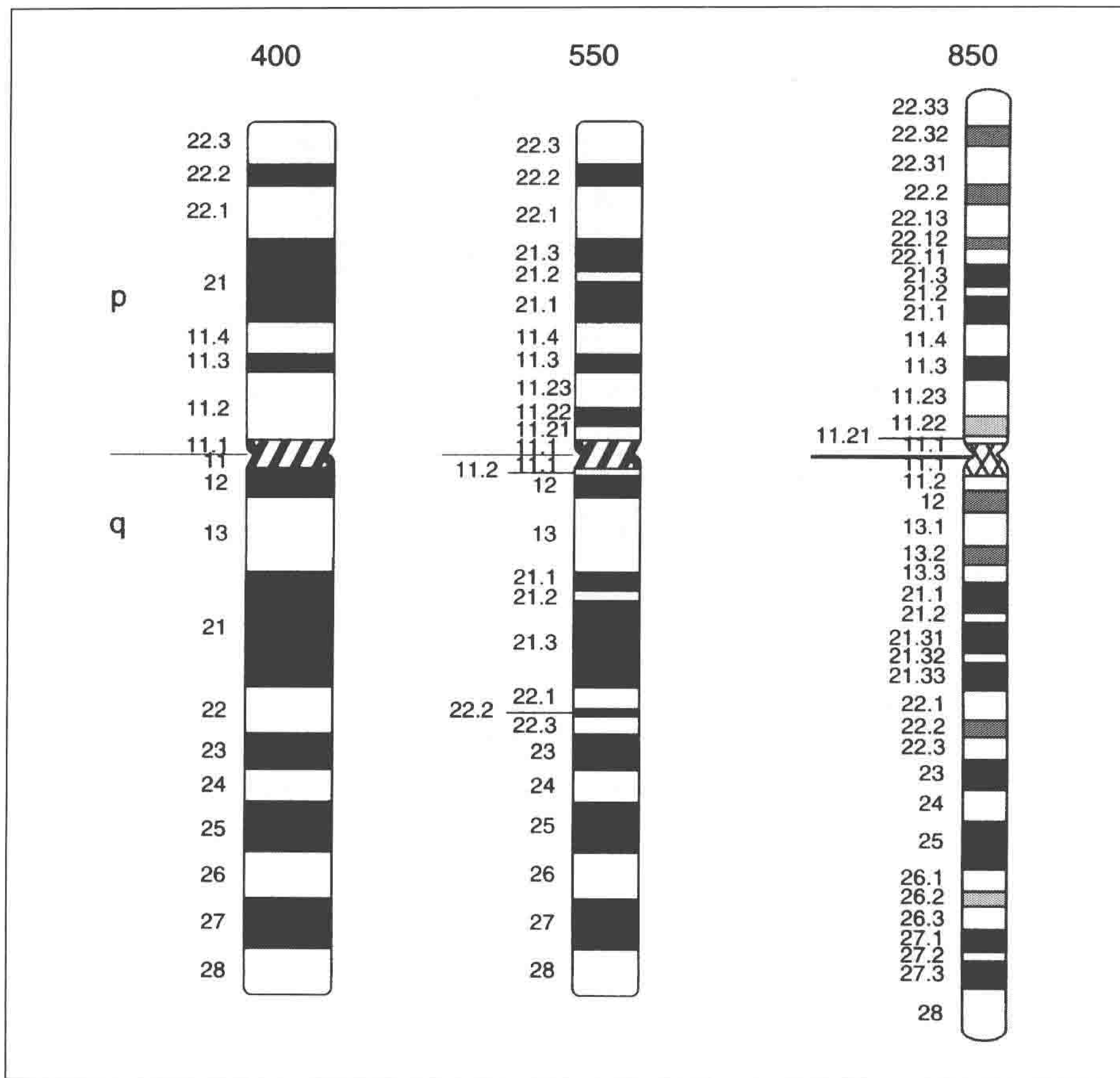


图 A. 2B. 23　X 染色体核型模式图。

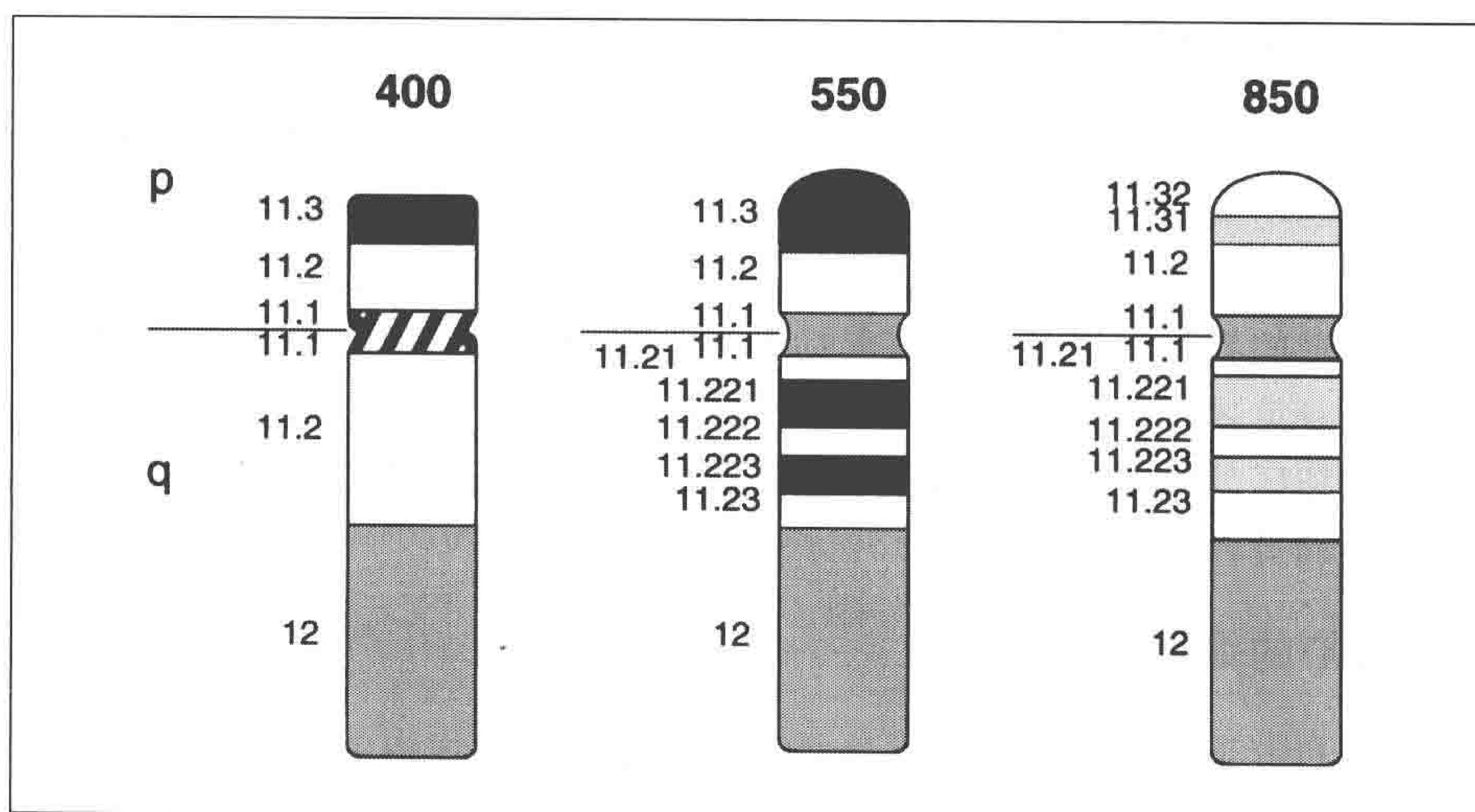


图 A. 2B. 24　Y 染色体核型模式图。该模式图由 Magenis 和 Barton（1987）的观察所得出的建议，长臂上常染色质带的数字已被扩展。

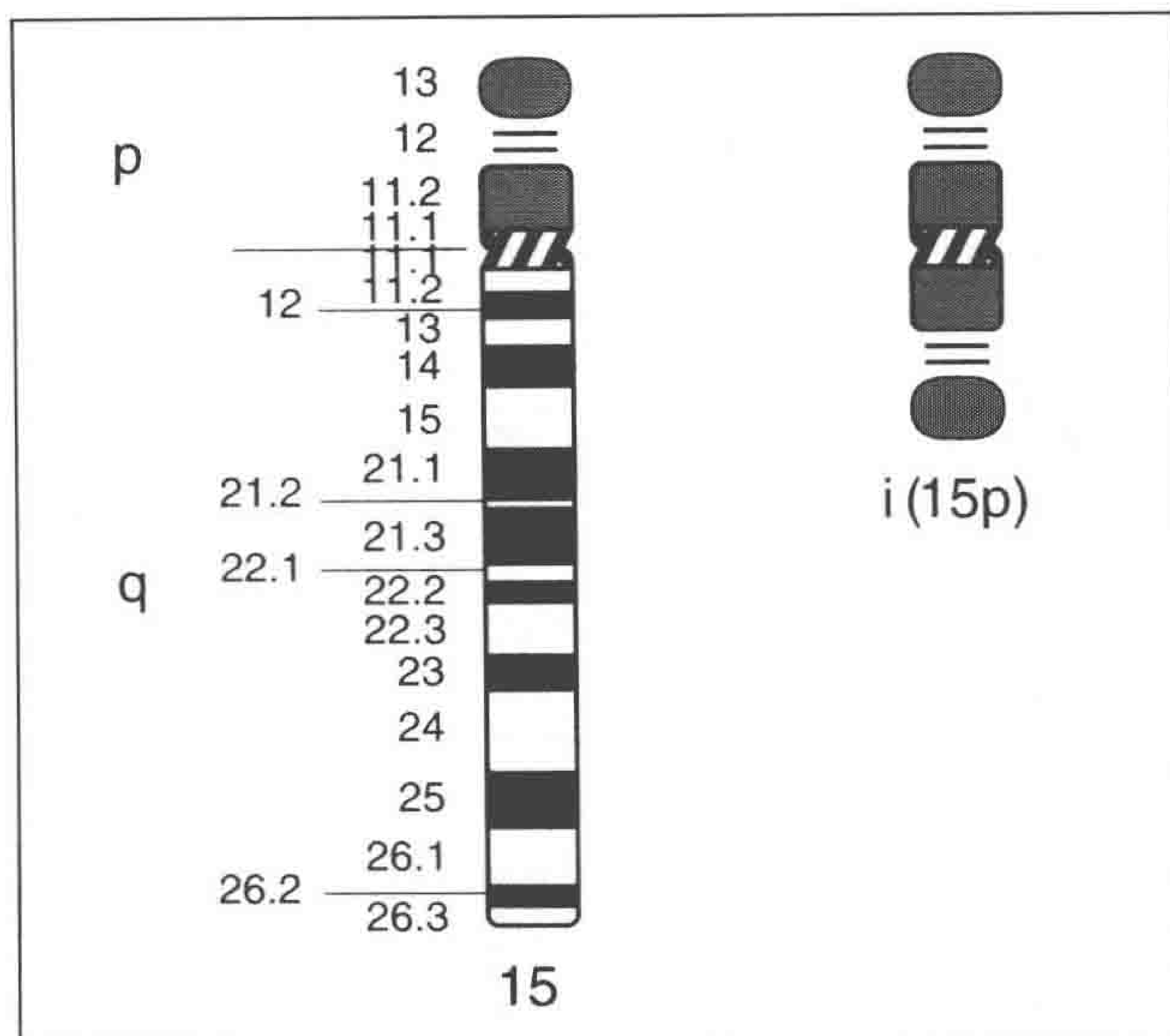


图 A. 2B. 25　由 15 号染色体短臂构成的等臂染色体。核型模式图左侧显示的是 15 号染色体的一个正常拷贝，右侧的是 15 号染色体短臂的等臂染色体。

染色体带的名称

人类细胞遗传学命名国际体制（ISCN，1995）也包括了以下对每个染色体条带命名的详细介绍；这部分材料是经过 S. Karger 的许可重印的（数字标记与 ISCN 1995 的章节数相应，以供参考）。

染色体界标、区、带的鉴定和定义

每条人类体细胞染色体被认为是由一系列连续的带构成，染色体上没有无带的区域。正如以前的定义，染色体带是染色体的一部分，因为染色亮度与其邻近部分相比或明或暗，因此可以明显地将其与邻近部分区分开来。这些带被指定到染色体臂的不同区域，它们被特定的界标分隔开，这些界标因其一致和独特的形态学特征而被定义，在鉴定染色体时有着重要的作用，它们包括染色体臂的末端、着丝粒和一些确定的染色体带。染色体带和区的编码数字从着丝粒起始依次排列至染色体的末端。染色体区是指位于染色体两个邻近界标间的区域。

染色体区和带的命名

染色体区和带是从着丝粒开始沿着每条染色体臂连续编码的。符号 p 和 q 分别代表每条染色体的短臂和长臂，着丝粒本身被指名为 10，其短臂部分为 p10，长臂部分为 q10。因此，在长短臂上邻近着丝粒的两个区被标记为 1 区，紧接着，稍远侧的区被命名为 2 区，依次类推。作为标记使用的带被考虑属于整个区域并且被看作区域中的第 1 条带。

在命名染色体上一个特定带时，需要包括四种符号：①染色体号；②臂的符号；③区号；④带号。这些符号依次连写，不必留间隔，也不用标点分开。例如，1p33 表示 1 号染色体短臂 3 区 3 带。

现存的界标和带的细分

要对现存的带再进一步细分时，要在原来带的命名后加上一个小数点，小数点后紧跟的数字表示的是每个亚带。亚带的数字也是从着丝粒开始向两侧连续编码的。例如，如果要将最初的 1p31 再细分为三个相等或不相等的亚带，那么这三个亚带就被标记为 1p31.1、1p31.2 和 1p31.3，1p31.1 亚带的位置在三个亚带中离着丝粒最近，而 1p31.3 离着丝粒最远。如果要对亚带再细分时，就直接在该亚带的命名后加上数字，不用再加上标点。例如，1p31.1 可能会再被细分为 1p31.11、1p31.12 等。虽然原则上可以被细分成在任何一个段的一些新带，但是一条带通常只被细分成三个亚带。

编者：Rhona R. Schreck，Christine M. Distèche，and David Adler

附录 2C　遗传连锁参考图谱：基于互联网资源的入口

CHLC

国际联合人类连锁中心（CHLC）主页的网址为 http：//www.chlc.org。该站点提供了 CHLC 的主要活动及资源、不同种类的遗传图谱、marker 的信息（如引物序列、等位基因大小、一些 CEPH 个体的等位基因大小、杂合性及重复类型）、出版物清单及其他相关站点的链接。

Généthon

Généthon 主页的网址为 http：//www.genethon.fr/php/index.php。这一站点提供了 Généthon 活动的描述，以及遗传、物理、转录图谱的入口。遗传图谱的信息包含了最终的 Généthon 图谱。有每个 marker 的详尽信息（引物序列、等位基因大小、CEPH1347-02 的等位基因大小，以及杂合性）。同样有其他相关网站的链接。

Marshfield

Marshfield 医学研究基金会（MMRF）主页的网址为 http：//www.marshfield-clinic.org/research/genetics/。该站点提供了医学遗传学中心的主要活动以及该中心研制和使用的图谱及 marker 的入口，包括详尽的基因型 marker、图谱、多重扫描设置及实验室所使用的方法。MMRF 同样可以提供 CEPH 家族的个体基因型。

Utah

Eccles 人类遗传学协会主页的网址为 http：//www.genetics.utah.edu/。这一站点提供了 Eccles 研究所的信息，包括 Utah Marker 研究组（UMDG）研制的图谱。mark-

er 信息包括引物、序列及等位基因的数目。并没有 CEPH 等位基因的大小。

LDB

Location 数据库主页的网址为 http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/ldb.html。这一站点提供了所有染色体的总体图谱。这些图谱的研制和升级是将不同的图谱和资源进行整合并按一定的统计学方法所得。它包括遗传图谱、放射性杂交、细胞遗传学图谱，以及物理图谱。并有可能提供这些原始数据的链接。

CEPH

CEPH（Center D'Etude du Polymorphisme Humain）主页的网址为 http://www.cephb.fr。该站点提供了 CEPH 的主要信息以及活动纪事，并提供了 CEPH 基因型的数据库。这一数据库包括 RFLP 及 VNTR 数据、广泛的微卫星标记数据。该数据库提供了 marker 的信息，包括等位基因的大小、频率和杂合性（对于已知）。此外，还提供了 CEPH 系谱中个体真实的基因型——为提高各项目及实验室之间等位基因召集的一致性提供了极为有用的信息。注意该数据库并没有提供引物序列的数据以及遗传图谱。

编者：Jonathan L. Haines

附录 2D　放射性同位素数据

表 A.2D.1　通常用的放射性核素的物理特性[a]

核素	半衰期	放射线	能量最大值/MeV	发射范围最大值	100%富集时的特定活性/（Ci/mg）	衰败后的原子	目标组织
^{3}H	12.43 年	β	0.0186	0.42cm（空气）	9.6	$^{3}_{2}He$	全身
^{14}C	5370 年	β	0.156	21.8cm（空气）	4.4mCi/mg	$^{14}_{7}N$	骨，脂肪
^{32}P[b]	14.3d	β	1.71	610cm（水）	285	$^{33}_{16}S$	骨
				0.8cm（水）			
				0.76 cm（树脂玻璃）			
^{33}P[b]	25.4d	β	0.249	49cm	156	$^{33}_{16}S$	骨
^{35}S	87.4d	β	0.167	24.4cm（空气）	43	$^{35}_{17}Cl$	睾丸
^{125}I[c]	60d	γ	0.27～0.035	0.2mm（石墨）	14.2	$^{125}_{52}Te$	甲状腺
^{131}I[c]	8.04d	β	0.606	165cm（空气）	123	$^{130}_{54}Xe$	甲状腺
		γ	0.364	2.4cm（石墨）			

a. 表格的数据与 Lederer 等和 Shleien 文献中的信息一致。

b. 推荐的防护装置是树脂玻璃；半值层（half-value）测定数值是 1cm。

c. 推荐的防护装置是石墨；半值层测定数值是 0.02mm。

表 A. 2D. 2　β 发射器的放射性发射防护[a]

能量/MeV	降低强度 50%的质量/（mg/cm²）	降低强度 50%的厚度			
		水	玻璃	石墨	树脂玻璃
0.1	1.3	0.013	0.005	0.0011	0.0125
1.0	48	0.48	0.192	0.042	0.38
2.0	130	1.3	0.52	0.115	1.1
5.0	400	4.0	1.6	0.35	4.2

a. 数据来源于 Dawson *et al*.（1986）。获得允许重印。

附录 2E　离心机和转子

本书所描述的离心法通常指的是相对离心力（RCF；单位是 *g*），与特定离心机的速度（r/min）和转子的型号相关。因为各个实验室所使用的仪器型号不尽相同，本研究必须使这些说明能够对其他的离心机和转子也适用。

RCF 和速度（r/min）的关系由以下的等式来决定：

$$\mathrm{RCF}=1.12r\ (\mathrm{r/min}/1000)^2$$

r 表示旋转轴心到特定离心样品之间的旋转半径。在大多数情况下，速度和相对离心力能够用 r 或 r_{max}——等于转子轴心到放在转子的井或桶里的离心管管底的距离获得。

表 A. 2E. 1 提供了 Du Pont（Sorvall）、Beckman、Fisher 和 IEC 制造的常用转子的 r_{max}值。在一些情况下（例如，人们会做一些改动使较小的试管也能在较大的转子井里使用）r_{max}就不能精确地表示旋转半径了。在这种情况下，我们应该参考转子的说明来获得合适的 r 值。

表 A. 2E. 1　普通转子的最大旋转半径（以离心机模型分类）

离心机模型[a]	最大离心半径/mm
Sorvall 离心模型 GLC-1、GLC-2、GLC-2B、GLC-3、GLC-4、RT-6000B、T-6000、T-6000B	
A/S400	140
H-1000B	186
HL-4（50ml 管槽）	180
HL-4（100ml 管槽）	204
HL-4（全能转子）	163
M 和 A-384（内排）	91
M 和 A-384（外排）	121
SP/X 和 A-500（内排）	82
SP/X 和 A-500（外排）	123
Sorvall 离心模型 RC-3、RC-3B、RC-3C	
H-2000B	261
H-4000 和 HG-4L	230
H-6000A	260
HL-8（全能转子）	221
HL-8（50ml 管槽）	238
HL-8（100ml 管槽）	247
HL-2 及 HL-2B	166
LA/S400	140

续表

离心机模型[a]	最大离心半径/mm
Sorvall 离心模型 RC-2、RC-2B、RC-5、RC-5B、RC-5C	
GSA	145
GS-3	151
HB-4	147
HS-4（250ml 管槽）	172
SA-600	129
SE-12	93
SH-80	101
SM-24（内排）	91
SM-24（外排）	110
SS-34	107
SV-80	101
SV-288	90
TZ-28	95
Sorvall 超速离心机	
T-865	91
T-865. 1	87. 1
T-875	87. 1
T-880	84. 7
T-1270	82
TFT-80. 2	65. 5
TFT-80. 4	60. 1
Beckman GP 系列离心机	
GA-10	123
GA-24	123
GA-24（带 10ml 离心管适配器）	108
GH-3. 7（管槽）	204
GH-3. 7（微型板）	168
GH-3. 8（管槽）	204
GH-3. 8（微型板）	168
Beckman TJ-6 系列离心机	
TA-10	123
TA-24	108
TA-24（带 10ml 离心管适配器）	123
TH-4（不锈钢管槽）	186
TH-4（100ml 管架）	201
TH-4（微型板）	165
Beckman AccuSpin	
AA-10	123
AA-24	108
AA-24（带 10ml 离心管适配器）	123
AH-4	163
Beckman J6 系列离心机	
JR-3. 2	206
JS-2. 9	265
JS-3. 0	254
JS-4. 0	226
JS-4. 2	254
JS-4. 2SM	248
JS-5. 2	226
微板载体（6-槽转子）	214
微板载体（4-槽转子）	192
Beckman J2-21 型离心机	
JA-10	158
JA-14	137
JA-17	123
JA-18	132
JA-18. 1（25°角）	112
JA-18. 1（45°角）	116
JA-20	108
JA-20. 1	115
JA-21	102
JCF-Z	89
JCF-Z 带小托轴	81
JE-6B	125
JS-7. 5	165
JS-13	142
JS-13. 1	140
JV-20	93

续表

离心机模型[a]	最大离心半径/mm	离心机模型[a]	最大离心半径/mm
Beckman L7 和 L8 型超速离心机		70.1 Ti 型	82.0
SW25.1	129.2	75 Ti 型	79.7
SW28	161.0	80Ti 型	84.0
SW28.1	171.3	VAC50	86.4
SW30	123.0	VC53	78.8
SW30.1	123.0	VTi50	86.6
SW40Ti	158.8	VTi65	85.4
SW41Ti	153.1	VTi65.2	87.9
SW50.1	107.3	VTi80	71.1
SW55Ti	108.5	**Beckman Airfuge 型超速离心机**	
SW60Ti	120.3	A-95	17.6
SW65Ti	89.0	A-100/18	14.6
15 型	142.1	A-100/30	16.5
19 型	133.4	A-110	14.7
21 型	121.5	ACR-90（2.4ml 垫圈）	11.8
25 型	100.4	ACR-90（3.5ml 垫圈）	13.4
30 型	104.8	Batch 转子	14.6
30.2 型	94.2	EM-90	13.0
35 型	104.0	**Beckman TL-100 型超速离心机**	
40 型	80.8	TLA-100	38.9
40.3 型	79.5	TLA-100.1	38.9
42.1 型	98.6	TLA-100.2	38.9
42.2Ti 型	104	TLA-100.3	48.3
45Ti 型	103	TLA-45	55.1
50 型	70.1	TLS-55	76.4
50Ti 型	80.8	TLV-100	35.7
50.2Ti 型	107.9	**其他离心机和转子[b]**	
50.3 Ti 型	79.5	Clay Adams Dynac	_[c]
50.4 Ti 型（内行）	96.4	Fisher Centrific	113
50.4 Ti 型（外行）	111.4	带4个转子的 Fisher Marathon 21K	160
55.2 Ti 型	100.3	带4个大粉碎机转子的 IEC Clinical 离心机	155
60Ti 型	89.9		
65 型	77.7	IEC general-purpose 离心机，Models HN、HN-SII 和 Centra-4	_[c]
70Ti 型	91.9		

a. Sorvall 离心机和转子是 Du Pont 公司产品；Beckman 离心机是 Beckman 公司产品；IEC 离心机是 International Equipment Co 公司产品；Clay Adams Dynac 离心机是 Becton Dicknson Labware 公司产品；Fisher 离心机是 Fisher Scientific 公司产品。有序信息详见附件4。

b. 这些仪器常用于“clinical”、“tabletop”或“low-speed”离心机。

c. 这些仪器允许一定范围内带可变旋转半径的枢轴环转子，如同有固定角和频率变化桶的转子允许多种适配器，这使它们能转动不同型号的筒。例如，普通 IEC 985 枢轴环转子能通过调整枢轴的松紧调节其旋转半径范围为 137～181mm。因此人工操作为特殊系统去获得精确的速度去转变 RCF 是有必要的。

作为以上等式的另一个用途，图 A. 2E. 1（离心转速＜21，000r/min）和图 A. 2E. 2（更快的转速）能够让我们在已知速度和 r_{max} 的情况下确定 RCF，或在 RCF 和 r_{max} 已知的情况下确定速度。我们通过校准两个已知的变量的标尺，然后再在标尺越过的不变的列中读出未知量。

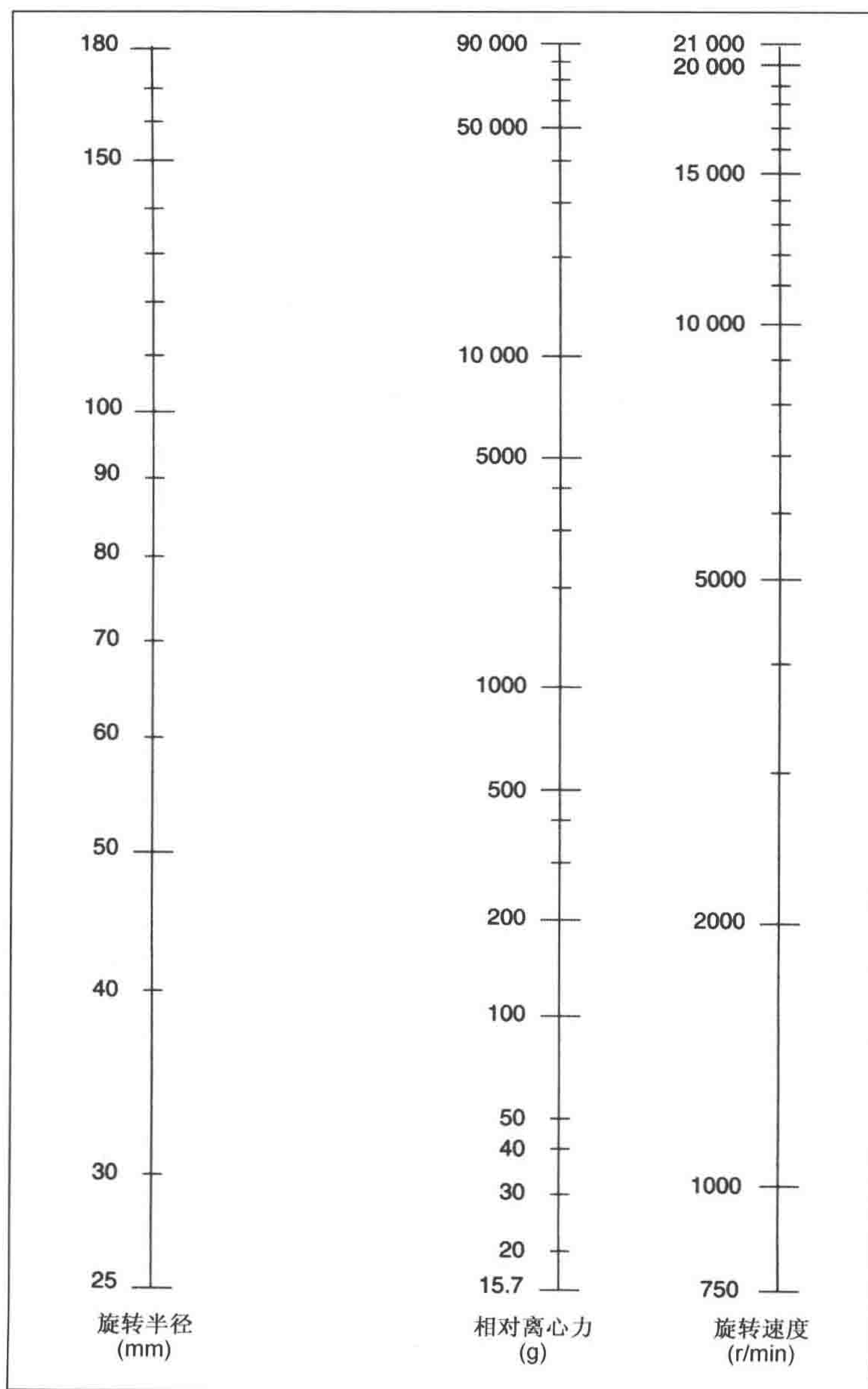


图 A. 2E. 1　低速离心机的相对离心力和转子速度的转换列线图。为确定已定线上的未知数值，用尺子比对另外两条线上确定的数值。尺子与已定线的交点即为所要的数值。对于高速离心，请使用图 A. 2E. 2。利用该附录开头的等式来计算可获得更精确的转换数值。常用转子的旋转半径可参考表 A. 2E. 1。

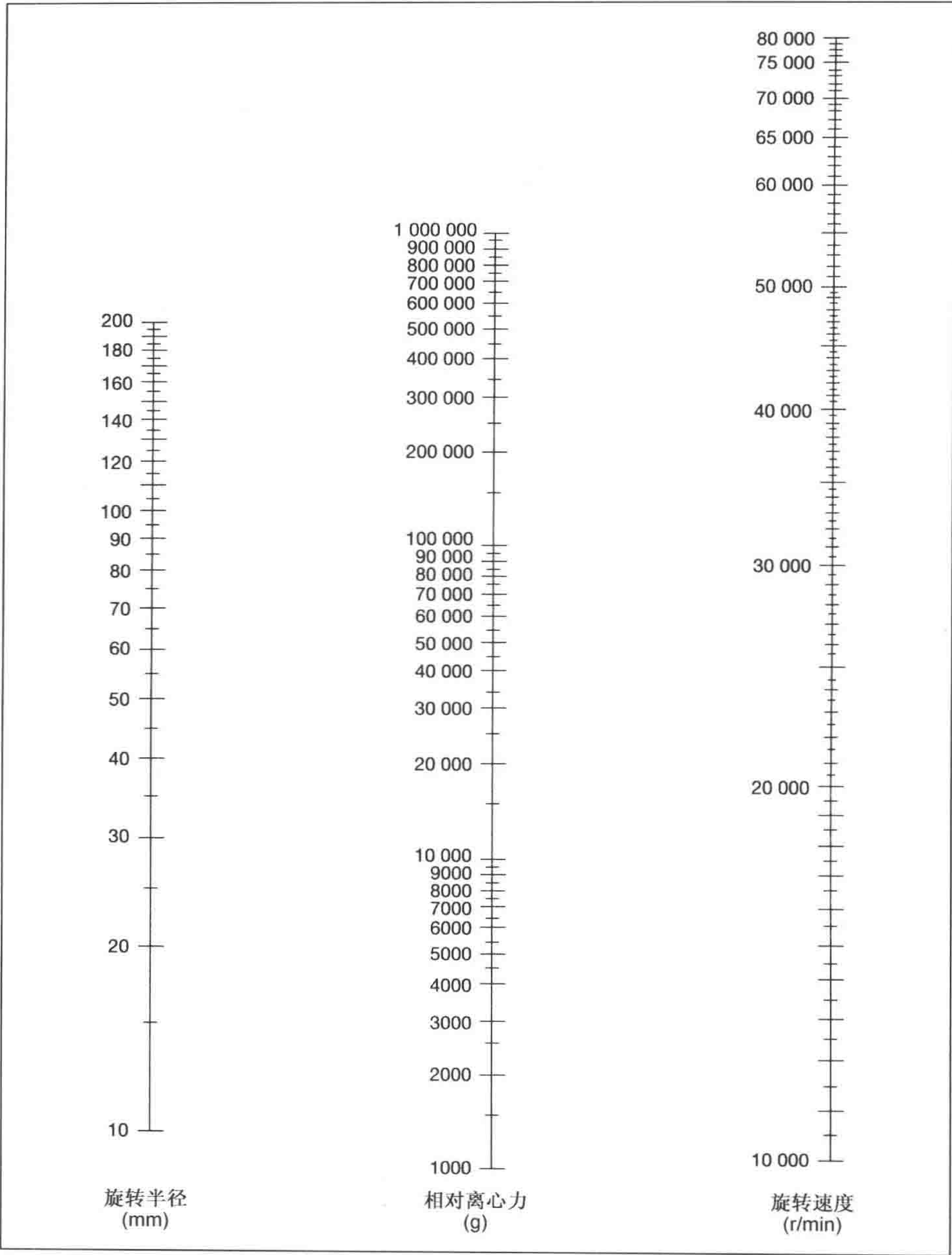


图 A. 2E. 2 列线图为离心机在高速离心运行时的相对离心力转换率，通过图 A. 2E. 1 运用列线图能说明离心的快慢。用附录开始的公式能得到更精密的转换率。表 A. 2E. 1 显示了常用转子的旋转半径。

附录3 常用技术

附录3A 从哺乳动物细胞中提取基因组DNA

基本方案1 从全血中提取DNA

材料（标√的条目参见附录1）

10ml 新鲜或者冻融的全血
√NKM 缓冲液，4℃
√重悬缓冲液
√10×TEN 溶液
√2mg/ml 蛋白酶 K（proteinase K）
√10%（*m*/*V*）SDS
√平衡酚
√25∶24∶1（*V*/*V*/*V*）酚/氯仿/异戊醇
24∶1（*V*/*V*）氯仿/异戊醇
√TE 缓冲液，pH 8.0
√透析缓冲液
冷冻离心机
摇床
透析管（MWCO 5000）
1.5ml 的储存管

1. 将1～15ml新鲜的或解冻的全血（小量为宜）加入到40ml 4℃预冷的NKM缓冲液中。振荡混匀，然后以4℃ 3500*g* 离心30min。弃去上清液到只留大约10ml。重悬沉淀并振荡混匀（如果必要可用巴斯德吸管吹打）直到没有块状物集结。
2. 加入重悬缓冲液至40ml，平衡离心管，4℃以3500*g* 离心30min。去上清，保留大约4 ml上清液。加入：
   0.5ml 10×TEN 溶液；
   0.25ml 2mg/ml 蛋白酶 K；
   0.5ml 10%SDS。
   缓慢地混合并在37℃下消化过夜。
3. 以等体积的平衡酚抽提DNA两次，用等体积的25∶24∶1酚/氯仿/异戊醇第二次抽提，以相等体积的24∶1氯仿/异戊醇第二次抽提。每次抽提都要在室温缓慢地混

合，室温下在摇床上摇 30min，在室温下 1500g，离心 15min，去除无用的有机相（通常在底层；相可能在高盐存在下颠倒）。

4. 将 DNA 溶液转移进透析管中。由透析缓冲液透析 4 次，每次 12h。保留最后一次更换的透析缓冲液 0.3ml。将透析了的 DNA 转入 1.5ml 的离心管。

5. 测定 DNA 的浓度。将 0.1ml DNA 溶液用 0.2ml TE 缓冲液稀释。被稀释了的 DNA 在 A_{260} 和 A_{280} 测定读数（一般 A_{260}/A_{280} 的比值 ≥1.7 为好；见附录 3D）。最后一次更换的透析缓冲液和没用过的透析缓冲液都要测定读数（如果透析完全，则吸收值应该相等）。

6. 用 TE 缓冲液适当地稀释 DNA 并等分，储存在可密封的 1.5ml 离心管中。每管加入 40μl 氯仿以防止微生物污染。标记管，紧密密封，在 4℃条件下可以储存若干年。如果 DNA 样品只用于做 PCR 用途，则可储存在－70℃待用。

如果 DNA 是做 Southern 分析之用，则 DNA 要避免冻凝，以防止在反复冻融过程中造成 DNA 降解。

备选方案 1　从细胞沉淀物中提取 DNA

附加材料（见基本方案 1，标√的条目参见附录 1）

培养的细胞（附录 3I 和 3J）
√磷酸盐缓冲液（PBS），灭菌
√蔗糖裂解液
50ml 的离心管

1a. 如果使用新鲜的细胞培养物：收集约 50ml 悬浮液，其中包含 5×10^7 个细胞的培养物，或者将等量的黏附生长的细胞先用胰酶消化，然后收集在 50ml 的离心管中。4℃ 1500g 离心 10min。除去上清液，将沉淀重悬在 1.0ml 无菌 PBS 中并转移到一个 1.5ml 的离心管中。1500g 离心 10min。去除上清液，并用干冰/乙醇浴或在－70℃冻结沉淀物。直到进行第二步操作时再解冻。

1b. 如果使用先前冷冻的细胞：融解细胞，然后以 1500g 离心 10min，去除上清液。

2. 用 40ml 蔗糖裂解液重悬沉淀物，旋涡振荡混匀。4℃以 3500g 离心 30min。然后进行 DNA 的抽提和透析（基本方案 1，第 2～5 步）。

备选方案 2　使用高盐沉淀法回收基因组 DNA

回收 DNA 可以直接地使用高盐/乙醇沉淀法来代替基本方案 1 中的冗长透析。但这种方法回收的 DNA 片段一般比使用透析法得到的小，但是这些 DNA 也足以在大多数的实验中使用。

附加材料（见基本方案 1）

5mol/L NaCl
100%和 70%乙醇

1. 分离和酚抽提 DNA（基本方案 1，第 1～3 步）。加入 5mol/L NaCl 至终浓度为

0.4mol/L。温和地加入 2 倍体积的 100%乙醇，轻柔的颠倒混匀，4℃ 3500*g* 离心 30min。

如果乙醇加得很慢，并且 DNA 足够浓缩，则 DNA 会立刻盐析在多余的乙醇中，会在乙醇的界面上显现出清晰的黏性物质。DNA 会直接缠绕复原，可用冻干回收。

2. 去除上清液，加入 5ml 70%乙醇，以 3500*g* 离心 30min。去上清液，用氮气流或冷干燥机干燥样品。在室温下用 1ml TE 缓冲液重悬 DNA，室温下静置过夜使 DNA 溶解。
3. 把 0.1ml DNA 加入到 0.2ml TE 缓冲液中。通过读取 260nm 和 280nm 的吸收值测量 DNA 样品的浓度（附录 3D）。

基本方案 2　从药签擦拭口腔分泌物中提取 DNA

材料（标√的条目参见附录 1）

50mmol/L NaOH

√1mol/L Tris · Cl，pH 6.5

70%乙醇

CYTO-PAK 和 Cyto-软刷子（CP-5 B；医用包装）或 6 号口径棉签（Allegiance Healthcare）

95℃加热块

1. 让提取患者轻轻地漱口两次。打开棉签包装，尽量避免污染，在提取患者的内颊中用棉签贴着搅动 30s。收回刷头，密封，尽快地提取 DNA，也可在 4℃最多储存 1 个星期。

提取自患者内颊的上皮细胞的 DNA 的量可能由于患者个体差异和取样者的技术变化很大。所以最好尽可能收集 2 刷子或 2～4 棉签的样品。取样的时候不要用力过大，否则重复地硬物刮取会使患者口腔内膜磨损，甚至出血。

2. 用移液器吸取 600μl 50mmol/L 的 NaOH 到 1.5ml 的离心管内。用剪刀剪断棉签，用灭菌的镊子将样品放入离心管中（2 个棉签头可以放在一个离心管中）。无菌剪刀在使用前后均要在 70%乙醇中清洗。
3. 用力振荡离心管中溶液并将离心管放在 95℃的加热块中加热 5min 完全裂解细胞。用灭菌的镊子取出离心管中的棉签头，只保留残余的溶液中含有的 DNA。加入 60μl 1mol/L Tris · Cl，pH 6.5，中和溶液，再次振荡混匀。

此时得到的 DNA 可以定量分析或直接用来做 PCR。取自口腔用来做 PCR 的 DNA 样品可以保存在 4℃或－20℃。

由于此时 DNA 没有高度纯化，所以精确定量既困难，又没有必要。一般来说，5～10μl DNA 足够用来做一次 PCR，可以用 DNA Dipstick kit（Invitrogen）来估计 DNA 的产量，DNA 的产量变化很大，但一般使每个刷子可以得到 4～8μg DNA。从内颊细胞提取的 DNA 应该尽快使用。经过长期储藏（>1 月）后，DNA 虽然仍可以使用，试验结果质量下降，甚至可能是很大的下降，故强烈建议不要长期的贮藏！

参考文献：Richards *et al.*，1994

编者：John R. Gilbert and Jeffrey M. Vance

附录3B DNA的抽提和沉淀

基本方案1 苯酚提取法

材料（标√的条目参见附录1）

待提取的DNA样品（单价阳离子浓度≤0.5mol/L）
√1∶1（V/V）酚/氯仿或25∶24∶1（V/V/V）酚/氯仿/异戊醇
24∶1（V/V）氯仿/异戊醇
√TE缓冲，pH 8.0

1. 估计DNA样品的体积，加入等体积的1∶1的酚/氯仿或25∶24∶1酚/氯仿/异戊醇，并混合形成乳状液。

   萃取的DNA片段的大小会受到混合技术的影响，因为强烈搅拌会对DNA产生剪切作用。一般而言，漩涡混匀得到的片段≤10kb，人工混匀得到的DNA片段为10～30kb，轻微摇转动得到的片段大小在30kb以上。

   如果样品体积<50μl，则要用TE缓冲液稀释（如稀释到≥100μl），因为小的体积很难萃取。≤400μl的样品可以用一个离心管萃取。更大体积的样品可以在有密封盖的聚丙烯管中萃取。

2. 以最大的速度，室温下离心15s。

   应当离心够长时间来使有机相和水相清楚分离。蛋白质将会在有机相和水相的交界处形成可见的白色沉淀物。更大的体积应该于室温1200g离心5min。

   如果原始溶液中盐的浓度<0.5mol/L，或蔗糖的浓度<10%（m/V），则包含DNA的水相应该是最上层的。否则，有机相和水相的位置可能颠倒，所以应该在用乙醇沉淀法证实DNA存在之前将有机相也保存。

3. 把水相吸到一个新的离心管中（最好用剪过的枪头）。
4. 或者（可取得最大的产物）：用相等体积的TE缓冲液，pH 8.0重新萃取剩余的有机相和交界面处残留液。按第2步的方法进行良好的混合和离心。将再次得到的水相和第3步收集的水相混合。
5. 用相等体积1∶1的酚/氯仿或25∶24∶1的酚/氯仿/异戊醇再次萃取管中的水相。混合，离心，如在第2和3步中那样收集水相。重复萃取水相，直到在交界处再没有可见的蛋白质。
6. 再次用等体积的24∶1氯仿/异戊醇去除水相中残余的苯酚。按第2步的方法混合，离心。回收并乙醇沉淀水相（基本方案2）。

   如果需要获得高分子质量的DNA，剩余的有机溶剂应该在4℃用大体积低离子强度的缓冲液渗析水相的方法来去除，或者水相可以用等体积的水或TE缓冲液平衡过的乙醚萃取两次，或者用蒸发的方法去除有机溶剂。

基本方案 2　乙醇沉淀 DNA

材料（标√的条目参见附录 1）

待沉淀的 DNA 样品

适当的一价的阳离子溶液（表 A. 3B. 1）

冰冷的 100％和 70％乙醇

√TE 缓冲，pH 8. 0

表 A. 3B. 1　沉淀 DAN 用一价阳离子溶液

一价阳离子溶液	储存液/(mol/L)	终浓度/(mol/L)	简述
乙酸铵溶液	10. 0	2. 0～5. 0	用于制备做 PCR 之用途的 DNA，可沉淀＞50 碱基的寡核酸：减少 dNTP 和小寡核酸的共沉淀。NH4$^+$ 可抑制 T4 连接酶活性
乙酸钾溶液，pH5. 5	3. 0	0. 3	用于异丙醇沉淀法分离质粒，抑制限制性内切核酸酶活性
乙酸钠溶液，pH5. 2	3. 0	0. 3	可沉淀＞50 碱基的寡核酸，用于最广泛的用途，但是对 PCR 有干扰作用
氯化钠溶液	5. 0	0. 2～0. 5	用于沉淀含 SDS 的样品。但是在 70％乙醇中可溶性低而难以去除，Na^+ 会抑制 T4 连接酶活性

1. 估计 DNA 样品体积并加入一价的阳离子溶液至表中给出的阳离子浓度（表 A. 3B. 1）。

　　如果样品 DNA 的一价阳离子浓度＞0. 5mol/L，DNA 应该用 TE 缓冲液稀释到离子终浓度为 0. 3mol/L。如果 DNA 中 $MgCl_2$ 的浓度＞10mmol/L，就要在乙醇沉淀前用 TE 缓冲液稀释到≤10mmol/L。DNA 样品若包含＞1mmol/L 磷酸盐或＞10mmol/L EDTA 则不能用乙醇沉淀；磷酸根盐离子或 EDTA 能被传统方法去除或 spin 柱层析法去除（附录 3E）。

　　样品≤400μl 能在 1. 5ml 的离心管中沉淀；更大的体积应该在一个硅化加厚的 Corning 玻璃离心管中沉淀。

2. 加入 2～2. 5 体积（已经加上了增加的一价离子溶液）的冰冷 100％乙醇。混合好，碎干冰中保持 15～30min，或在－20℃的制冷机上至少保持 30min，或在－70℃冰箱中保持 15min。如果需要，可以在－20℃或－70℃下无限期保存 DNA 的乙醇溶液。

　　为了提高从低浓度 DNA 溶液（如＜10μg/ml）中提取 DNA 的回收率，可以做以下修改：①$MgCl_2$ 的终浓度可加到≤10mmol/L；② 乙醇的量增加到 3 倍体积并且干冰中的保持时间可以增加到 30min；③在第二步中可以在溶液和沉淀中加入 10μg 来自大肠杆菌、酵母菌或牛肝中的 tRNA。如果 DNA 会被 T4 多核苷酸激酶磷酸化，则不能使用外来 tRNA。如果 DNA 片段是＜100bp 或＜0. 1μg/ml，保持时间应该被增加到大于 1h。

　　或者选择：用等体积的异丙醇沉淀 DNA。然而，异丙醇比乙醇更难挥发，因此

比较难去除。而且，用异丙醇沉淀的DNA更难以使用冻干机冻干。此外，用异丙醇沉淀还会同时沉淀下盐和蔗糖，因此，用异丙醇沉淀DNA通常还要再用乙醇沉淀一次。

3. 4℃以最大的速度离心10min。

只要≥10μg DNA沉淀就应该可见。在离心时，将离心管的绞合部朝上放置可以用来确保DNA沉淀在管的一侧。

如果要制备小DNA片段或溶液中的DNA含量太低，则需要较长的离心时间。如果在Corning玻璃管中处理，则需要在固定转子上以8000g，4℃，离心15min。

4. 使用一个巴斯德吸管小心地从DNA沉淀相对的一面伸入，吸去上清。加入1ml冰预冷的70%乙醇，4℃，最大速度离心5min。重复一次。保留上清直到确保得到DNA沉淀。

因为润滑剂的作用，DNA沉淀不能紧紧地黏附在管壁上（≤50%可能黏附在管壁上)，所以吸取上清液时要小心操作，可用少量异丙醇润洗管壁。

如果DNA片段小于200bp，则要用冰预冷的95%（*V/V*）乙醇淋洗DNA沉淀。

5. 用Speedvac蒸发器或真空干燥器干燥DNA沉淀，或者直接在空气中干燥。

高分子质量的DNA用空气干燥法干燥则更易于重新溶解。

6. 溶解DNA。如果要用来限制性酶切，由于酶切对缓冲液的限制要求，则将DNA溶解在适当的水中。如果将来用途不确定，则溶解在TE缓冲液，pH 8.0。

低浓度小量的DNA（举例来说，约25pg，在<1mg/ml）可以被快速地溶解。较高的浓度下，可能需要漩涡振荡，而且在65℃加热5min，基因组DNA在温和的混匀条件下也要几天才能充分溶解。

DNA很难溶解在含有$MgCl_2$或>0.1mol/L NaCl的溶液中。DNA容易被溶解在低离子强度缓冲液中，而且溶解DNA的溶液要调节到合适的$MgCl_2$或NaCl浓度。

DNA可以在TE缓冲液，pH 8.0，4℃被短期保存，或分装后在－20℃或－70℃下保存若干年；尽量避免反复冻融DNA！

参考文献：Wallace，1987

附录3C　从固定的石蜡包埋组织切片中制备DNA

固定的石蜡包埋组织（PET）中提纯的DNA通常不能用于Southern杂交分析，但是用来做较小范围的RCR扩增通常是可行的。

基本方案　使用MIXED-BED螯合型树脂提取DNA

材料（标√的条目参见附录1）

石蜡包埋组织切片，5～10μm厚

√PET溶液

√Chelex 100填料

65℃水浴锅和 100℃水浴锅

1. 将 2～10 个 5～10μm 厚的组织切片放入一个灭菌的 1.5ml 的离心管中。加入 200μl PET 溶液，室温下短暂离心。65℃水浴加热样品直至石蜡熔化（大约需 5min）。在漩涡混匀器上轻微的短暂混匀，然后室温下短暂离心，将离心管重新放回 65℃水浴过夜。

   如果这种消化的方法不能提取出可供扩增的 DNA，则每隔 2h 加入一份或几份蛋白酶 K 增加消化效果。

2. 加入 100μl Chelex 100 填料，然后沸水水浴 10min。室温下最大转速离心 5min，此时，DNA 层在石蜡层之下，树脂层之上。用一个移液器吸头捅破坚硬的石蜡层，将溶液小心地吸到一个新的离心管中，注意不要吸出 Chelex 玻璃珠。由于 Chelex 会抑制 PCR 反应，所以如果不慎将 Chelex 随 DNA 溶液吸出，则重新离心再吸一次。DNA 可以在 4℃存储一个月，长期存储要放置在－20℃以下。
3. 可选步骤：用分光光度或染料吸附（dye-binding）的方法测定 DNA 的含量（见附录 3D）。

备选方案　从非最佳选择固定的组织中提取 DNA

如果用基本步骤不能提取出 DNA，或者需要用抽提样品做 DNA 扩增，而样品固定的方法已经被认为一定会影响 PCR 扩增时才使用这种方法提取 DNA。

附加材料（见基本方案；标√的条目参见附录 1）

二甲苯
100％和 70％的乙醇
√25∶24∶1（V/V/V）苯酚/氯仿/异戊醇
24∶1（V/V）氯仿/异戊醇
√3mol/L 乙酸钠，pH5.2（用 0.45μm 的滤器过滤灭菌，可在室温下保存 6 个月）
√TE 缓冲液，pH 8.0

1. 将 2～10 个每个 5～10μm 厚的组织切片放入一个灭菌的 1.5ml 的离心管中（基本步骤，第 1 步）。如果 4 个或 4 个以上的切片同时抽提，则在 65℃加热 1min 以熔化石蜡。加入 1ml 二甲苯，漩涡混匀器混匀。室温下，最高转速离心 10min。倾出上清或用枪吸除去上清液。如果沉淀过大，则重新用二甲苯处理，再离心。
2. 加入 1ml 100％乙醇。短暂漩涡混匀。室温下，最高转速离心 10min。吸去上清液。加入 1ml 70％乙醇。短暂漩涡混匀。室温下，最高转速离心 10min。倾出上清液或用枪吸除去上清液。真空干燥或操作台上空气中自然干燥。
3. 加入 200μl PET 溶液。65℃水浴 5min。轻微漩涡混匀，然后室温下短暂离心。65℃水浴过夜。
4. 加入 100μl Chelex 100 填料。将样品置于沸水中水浴 10min。室温下，最高转速离心 10min。将溶液吸到一个新的离心管中，注意不要吸出 Chelex 玻璃珠。
5. 使用 200μl 25∶24∶1（V/V/V）苯酚/氯仿/异戊醇抽提 DNA 溶液（附录 3B）将水相置于一个新的离心管中，再重复抽提一次。使用 24∶1（V/V）氯仿/异戊醇抽提

水相。加入 1/10 体积的 3mol/L 乙酸钠，pH5.2。加入 2 体积的 100%的乙醇（附录 3B）。室温下静置 15min。室温下，最高转速离心 15min。吸去上清液。

6. 使用 70%的乙醇洗涤沉淀，再重复离心。去除 70%的乙醇，然后在真空中或空气中干燥沉淀。将沉淀重新溶于 50μl TE 或水中（也可视实际沉淀体积而定用于溶解的量）用分光光度或染料吸附的方法测定 DNA 的含量（附录 3D）。

参考文献：Mies，1994

编者：Edward A. Fox

附录 3D 使用分光光度计和荧光分光光度计测定 DNA 和 RNA 的含量

这种方法适用测定的 DNA 范围为 5～10ng/ml 到 50μg/ml（表 A.3D.1）。

表 A.3D.1 DNA 和 RNA 的吸收性质和溴化乙锭荧光光谱分析

性质	吸光度（A_{260}）	荧光物质	
		H33258	EtBr
敏感度/（μg/ml）			
DNA	1～50	0.01～15	0.1～10
RNA	1～40	n. a.	0.2～10
信号比			
DNA/RNA	0.8	400	2.2

基本方案 利用吸收光谱法测定核酸含量

测量 A_{260} 可以在微克数量级上测定制备纯度较高的核酸的含量。吸收值并不能区别 DNA 和 RNA，但是 A_{260} 和 A_{280} 的比值可以计算核酸的纯度。例如，蛋白质在 280nm 处有一个吸收峰，这样会减小 A_{260}/A_{280} 的值。而溶液中有微粒或比色皿不干净会在 325nm 处有吸收峰，像蛋白质和苯酚这样的多肽或芳香族污染则会在 230nm 处有吸收峰。

材料（标√的条目参见附录 1）

√1×TNE 缓冲液
待测的 DNA 样品
√小牛胸腺（calf thymus）DNA 标准溶液
配套的 semi-micro 石英分光光度计比色皿（1cm 通径）
单光或者双光的分光光度计（紫外光到可见光）

1. 吸取 1.0ml 1×TNE 缓冲液到比色皿中。将比色皿放到分光光度计中，读取 325nm 的吸收值（如果有必要的话注意比较相对于蒸馏水作空白的读数比值），然后调零。在双分光光度计中同时使用空白溶液作对照；对于单光分光光度计，则移去空白比色皿，然后插入含有 DNA 样品的比色皿或同一溶液的标准稀释品悬浮液，读数。重

复此操作，读出 280nm、260nm 和 230nm 的吸收值。

2. 定量 DNA 浓度，要结合 A_{260} 的读数，使用如下的合适方程式测定 DNA 的浓度：

单链 DNA　$C(\text{pmol}/\mu\text{l}) = \dfrac{A_{260}}{10 \times S}$

$C(\mu\text{g/ml}) = \dfrac{A_{260}}{0.027}$

双链 DNA　$C(\text{pmol}/\mu\text{l}) = \dfrac{A_{260}}{13.2 \times S}$

$C(\mu\text{g/ml}) = \dfrac{A_{260}}{0.020}$

单链 RNA　$C(\mu\text{g/ml}) = \dfrac{A_{260}}{0.025}$

寡核苷酸　$C(\text{pmol}/\mu\text{l}) = A_{260} \times \dfrac{100}{1.5N_A + 0.71N_C + 1.20N_G + 0.84N_T}$

S 代表 DNA 片段的大小，单位是 kb；N 代表 A、G、C、T 的碱基数目。

对于单链和双链的 DNA 和单链的 RNA 来说，这些方程式是在假定 1cm 通径的比色皿和中性 pH 条件下设定的。对于寡核苷酸来说，更方便的浓度单位是 pmol/μl。由于总的吸收值是单个碱基吸收值的和，所以寡核苷酸的碱基构成对于吸收值有决定性的影响（表 A.3D.2）。

表 A.3D.2　不同 DNA 碱基的摩尔消光系数[a]

碱基	260nm 的摩尔消光系数
A	15 200
C	7050
G	12 010
T	8400

a. 在 260nm 处测量；见 Wallance 和 Miyada，1987

3. 使用 A_{260}/A_{280} 值并读取 A_{230} 和 A_{325} 的吸收值来估算核酸样品的纯度。

比值在 1.8～1.9 和 1.9～2.0 分别代表样品的 DNA 和 RNA 的纯度很高，如果有污染物（如蛋白质）则会在 280nm 处有吸收，会降低 A_{260}/A_{280} 值。

在 230nm 的吸收反映有苯酚、尿素的污染，而 325nm 的吸收表示溶液中的污染物是微粒或比色皿不干净。325nm 处的光散射可在 260nm 处放大 5 倍。

对于高纯度的样品，在 4 个波长下的典型吸收值见表 A.3D.3。

表 A.3D.3　纯 DNA 光谱光度测量值[a]

波长/nm	吸光率	A_{260}/A_{280}	浓度/（μg/ml）
325	0.01	—	—
280	0.28	—	—
260	0.56	2.0	28
230	0.30	—	—

a. 高纯度小牛胸腺 DNA 悬浮在 1×TNE 标准溶液中的典型吸收值，DNA 浓度默认为 25μg/ml。

备选方案1 使用DNA结合的荧光染料Hoechst 33258测定DNA含量

专门用于测定纳克级的DNA，Hoechst 33258荧光染料对RNA亲和性很低，且无论对全细胞匀浆还是纯化的DNA样品同样有效。但是这种荧光染料对于DNA组分的改变很敏感，而且优先结合到富含A-T的区域上。

附加材料（见基本方案，标√的条目参见附录1）

√Hoechst 33258分析液

专用滤波荧光计（Hoefer TKO100）或扫描荧光分光光度计（Shimadzu model RF-5000或Perkin-Elmer model LS-5B或LS-3B）激发波长365nm，发射波长460nm

荧光计用石英分光光度计比色皿或一次性丙烯树脂比色皿（Sarstedt）

Teflon搅动棒

1. 将扫描荧光分光光度计设定在激发波长365nm，发射波长460nm（不必要使用专用滤波荧光计）。
2. 移液器吸取2.0ml Hoechst 33258分析试剂到比色皿，置于样品槽内，作为不含DNA的背景读数。如果荧光计有浓度读数显示模式或者可以创建标准曲线，将空白溶液读数设为0。否则就要记下每一个相对荧光单位的读数，确保每一次使用的比色皿都要在空白下读数，因为每一个微小的变化都会引起背景读数的改变。
3. 比色皿还是放在样品槽中，将2μl DNA标准品加入到空白的Hoechst 33258分析试剂中，用Teflon搅动棒在比色皿中搅动混匀或将比色皿盖上，颠倒混匀。在相对荧光单位激发下读数或者设定浓度显示等于最终DNA浓度。用未使用的分析溶液重复测量剩余的DNA标准品（有必要的话先做机器调零或者空白调零）。

   如果有必要，将DNA标准品使用前在A_{260}读数（基本方案）。

   使用测序胶上样用的移液器吸头可将上样量误差减少到最小，使用前将移液器吸头用样品润洗，移液时确保移液器吸头上没有挂额外的液滴。

   样品设定2或3个平行管读数，每次都要读空白对照。空白对照异常或者空白对照不稳定分别说明比色皿污染或者是溶液中含有杂质。
4. 未知样品重复第3步的操作。

   0.1μg/ml的染料浓度足以定量最大约500ng/ml的DNA含量。将染料的工作浓度增加到1μg/ml Hoechst 33258可以测量到15μg/ml DNA，但是不可以测定到浓度太低的样品（低至5～10ng/ml）。≤10μl样品量可以加入到2.0ml/份Hoechst 33258分析试剂。

备选方案2 使用溴化乙锭检测DNA和RNA

溴化乙锭与Hoechst 33258相比而言不受DNA碱基组成的影响。尽管溴化乙锭检测DNA和RNA的灵敏度也可以达到纳克级，但是不如Hoechst 33258灵敏。但当DNA样品中还有RNA污染或DNA样品中GC含量较高时（此时用Hoechst 33258检测信号极弱），人们常用溴化乙锭来代替Hoechst 33258做分析。用溴化乙锭分析时需

要一个激发波长为302nm或546nm、发射波长为590nm的荧光计。

附加材料（见基本方案，标√的条目参见附录1）

√溴化乙锭分析溶液

1. 吸取2ml溴化乙锭分析溶液到合适组分的比色皿中，置于样品槽内。将激发波长设为302nm（使用石英比色皿时）或546nm（使用玻璃比色皿时），发射波长设为590nm。读取DNA不存在时的发射读数作为背景。如果仪器有浓度读数显示模式或者可以创建标准曲线，用空白溶液将机器调零。否则就要记下每一个相对荧光单位的读数。
2. 按照备选方案1中的第3步操作对样品进行读数和标定，按照备选方案1的第4步操作读未知样品的发射波长。

   染料浓度为5μg/ml的溴化乙锭分析液可以用来测定DNA终浓度为1000μg/ml的样品；染料浓度为10μg/ml的溴化乙锭分析液可以用来测定DNA终浓度的范围达到10μg/ml，但是也只能用于DNA浓度大于1μg/ml的样品。体积大于10μl的样品，可以加入到2.0ml每份的溴化乙锭分析液中。

参考文献：Labarca and Paigen，1980

编者：Sean R. Gallagher

附录3E DNA酶标记法

基本方案1 UNIFORM切口平移DNA标记法

切口转移常用来制备文库扫描、基因组DNA杂交、原位杂交所需要的特异性探针。

材料（标√的条目参见附录1）

√0.5mmol/L 3dNTP混合物（不加dATP）

√5～15U *E. coli* DNA聚合酶Ⅰ，10×缓冲液（缓冲液见附录1）

100μCi [α-^{32}P] dATP（3000Ci/mmol）

√1mg/ml DNase Ⅰ储存液，使用前稀释到1/10 000标准酶稀释液（附录1）

待标记DNA

√0.5mol/L EDTA

10mg/ml tRNA

√TE缓冲液，pH 8.0

1. 在冰上准备如下反应混合液（一共是25μl）：

   2.5μl 0.5mmol/L 3dNTP混合物；

   2.5μl 10×*E. coli* DNA聚合酶Ⅰ缓冲液；

   10μl 100μCi [α-^{32}P] dATP；

1μl 稀释的 DNase Ⅰ；

1μl 5～15 U *E. coli* DNA 聚合酶Ⅰ；

加水到 25μl。

将 0.25μg DNA 加入到 8μl 反应混合液中，立即在 12～14℃孵育 15～45min。

DNase Ⅰ的用量对于最佳的切口平移非常关键，建议对每一批次的酶作标定曲线决定用量，为了实验的可重复性，最好准备 1mg/ml DNase I 的溶液储存。

纯化低熔点琼脂糖中的 DNA，加入 8μl 熔化的凝胶切片（37℃）。在凝固的混合物中切口平移反应仍会发生（有时效率会降低）。

2. 加入 1μl 0.5mol/L EDTA、3μl 10mg/ml tRNA、100μl TE 缓冲液 pH 8.0 终止反应。用苯酚抽提（附录 3B），然后将水相转移到新管。如果 DNA 是以存在于融胶切片中的形式加入，将终止液重新在 70℃孵育 10min 重新熔化。
3. 用 spin 柱层析法从非结合放射性前体中分离出标记的 DNA（支持方案 1）。如果需要，在上样前取出 1μl 份到 spin 柱子测定酸性沉淀的 ^{32}P 的结合（支持方案 2；特异活性要达到 10^8 cpm/μg）。

备选方案　随机寡核苷酸引物合成法标记 DNA

这个方法是用切口平移法制造均一的高特异性放射性 DNA 的备选方案。利用了 Klenow 片段活性（*E. coli* 聚合酶Ⅱ的 C 端 70% 的片段）。

附加材料（见基本方案 1，标√的条目参见附录 1）

√10×*E. coli* 聚合酶Ⅰ缓冲液

3～8U/μl Klenow 片段

随机六核苷酸

1. 用合适的限制性内切核酸酶消化 DNA。用凝胶电泳法纯化（附录 3G），或者乙醇沉淀（附录 3B）。在 pH 8.0 的 TE 缓冲液中重悬。
2. 在冰上准备如下反应缓冲液：

   2.5μl 0.5mmol/L 3dNTP 混合物；

   2.5μl 10×*E. coli* 聚合酶Ⅰ缓冲液；

   5μl（50μCi）[α-^{32}P] dATP；

   1μl（3～8U）Klenow 片段。
3. 每 30～100ng DNA 混合 1～5μg 随机六核苷酸引物（总量 14μl），煮沸 2～3min，然后置于冰上。
4. 在变性 DNA 中加入 11μl 第 2 步中得到的反应混合物，然后立即在室温下孵育 2～4h，停止反应通过加入：

   1μl 0.5mol/L EDTA；

   3μl 10mg/ml tRNA；

   100μl TE 缓冲液，pH 8.0。

   酚抽提，将水相转移到新管。如果 DNA 之前是被加入到融胶切片中的，将终止混合液重新在 70℃孵育 10min 重新熔化。

5. 用 spin 柱层析法从非结合的放射性前体中分离出标记的 DNA（支持方案 1）。如果需要，在上样前取出 1μl 份到 spin 柱子测定酸性沉淀的^{32}P 的结合（支持方案 2；特异活性要达到 10^8cpm/μg)。

基本方案 2　利用 T4 多聚核苷酸激酶的 5′末端标记寡核苷酸法

材料（标√的条目参见附录 1）

√50mmol/L Tris · Cl，pH 7.5
10mmol/L $MgCl_2$
5mmol/L DTT
1～50pmol 去磷酸化 DNA，5′端
（专一活性＞3000Ci/mmol)
50μg/ml BSA
√20U T4 多聚核苷酸激酶和 10×缓冲液（缓冲液见附录 1）
√0.5mol/L EDTA
75℃水浴或者热块

1. 照如下方式准备 30μl 反应液：
50mmol/L Tris · Cl，pH 7.5；
10mmol/L $MgCl_2$；
5mmol/L DTT；
1～50pmol 去磷酸化 DNA，5′端；
50pmol（150μCi）[γ-^{32}P] ATP；
50μg/ml BSA；
加水到 30μl。
加入 20U T4 多聚核苷酸激酶在 37℃孵育 1h。
2. 75℃加热 10min 后用 1μl 1.5mol/L 的 EDTA 终止反应。酚氯仿抽提样品（附录 3B）用 spin 柱层析法从一致性放射性前体中分离出标记的 DNA（支持方案 1）。或者加反应混合物到 PCR 反应中（单元 2.1）不通过纯化而扩增产物。

支持方案 1　用 spin 柱层析法从非结合性 DNTP 前体分离放射性标记的 DNA

材料（标√的条目参见附录 1）

树脂：如 Sephadex G-50（Pharmacia）或者 Bio-Gel P-60（Bio-Rad）
√TE 缓冲液，pH 8.0
放射性样品：含有放射性前体的反应混合液（基本方案 1 或 2 或备选方案）
500ml 螺旋盖的瓶子
IEC 医用离心机
5ml 一次性注射器
硅化玻璃丝

50ml 聚丙烯管子

1. 在一个装入 300ml TE 缓冲液螺旋盖子的 500ml 瓶子中，加入 30g 树脂，65℃加热几个小时（或者室温下过夜）。冷却到室温，倒出多余的 TE 缓冲液，换上 1/2 体积的新鲜缓冲液（相对于树脂的量而言）。储存在室温或者 4℃。
2. 将干净的硅化玻璃丝伸入 5ml 一次性注射器的底部。在注射器内注入悬浮样的膨胀的树脂，放到一个 50ml 聚丙烯管子中，250*g* 离心 2～3min 来塞紧柱子（调整离心的时间和转速使得树脂被压得既不会太松也不会太紧）。
3. 用 TE 缓冲液，pH 8.0 稀释放射性样品到 100μl，上样到柱子的中心，将注射器换到一个新的 50ml 离心管子，在 700～1100*g* 离心 5min，保存管底含有标记 DNA 的液体。适宜地处理放射性样品残余。

支持方案 2　用三氯乙酸(TCA)沉淀法测定 DNA 和 RNA 中的放射性

材料（标√的条目参见附录 1）

放射性样品：含有放射性前体的反应混合物（基本方案 1 或 2 或备选方案）
√含有超声处理的 500μg/ml 鲑精 DNA 的 TE 缓冲液，pH 8.0（见各自配方）
√10%（*m*/*V*）三氯乙酸（TCA）或（附录 1）
冰预冷的 100%乙醇
液闪液（甲苯型）
玻璃纤维滤纸（2.4cm 直径，Whatman GF/A）
过滤装置

1. 将 100μl 含有 500μg/ml 声处理的鲑精 DNA 的 TE 缓冲液 pH 8.0 装入到一次性玻璃管中，加入一定量（通常是 1μl）含有放射性前体的的反应混合液。取混合物中的 10μl 点到一张玻璃纤维滤纸上，放在一边在第 3 步时使用。剩下的 90μl，加入 1ml 冰预冷的 10% TCA 或者酸性沉淀溶液，在冰上孵育 5～10min。
2. 通过另一张玻璃纤维滤纸过滤溶液收集沉淀。用 3ml 10% TCA 或者酸性沉淀液润洗管子通过滤纸倒出，用 3ml 溶液洗膜 4 次，或者更多次，然后用 3ml 乙醇洗涤。
3. 把两张膜通过热灯干燥（不一定要使用闪烁液，但是闪烁液更适合含水样品），然后分别放到 3ml 甲苯型的闪烁液中，用液闪计数仪测量放射性。用第二张膜（测量核内的放射性）的 cpm 比上第一张膜（计算样品中的总放射性）的 cpm 计算进入核内的放射性结合性。

编者：Stanley Tabor and Kevin Struhl

附录 3F　变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

基本方案

含高浓度尿素作为变性剂的聚丙烯酰胺凝胶可以分辨短片段（<500 核苷酸）的单

链 DNA 或 RNA 片段上小到一个碱基的差异。

材料（标√的条目参见附录 1）

装在洗瓶中的 70%乙醇或异丙醇
5%（*V*/*V*）二甲基二氯硅烷（Sigma）/$CHCl_3$
√变性丙烯酰胺胶溶液
TEMED
10%（*m*/*V*）过硫酸铵（保存在 4℃，每周更换）
√1×TBE 缓冲液，pH 8.3～8.9
含有甲酰胺和 marker 染料的电泳样品（如单元 2.1、2.2、9.3）
30cm×40cm 胶板，前板，后板
0.2～0.4mm 同一厚度的边条
大号书夹
60ml 注射器
0.2～0.4mm 鲨鱼齿梳子或者成形梳子
测序胶电泳仪
巴斯德吸管或者 Beral 公司的 Beral 细管
铅结合电源
95℃热块或水浴箱
46cm×57cm 凝胶吸水纸（如 Whatman 3MM）
Kodak XAR-5 X 射线底片

1. 仔细地用肥皂和水清洗 30cm×40cm 胶板的前板和后板，用去离子水涮洗好后干燥。用装在洗瓶中的 70%乙醇或异丙醇湿润玻板，然后用 Kimwipe 纸巾或者其他不掉屑的纸巾擦干。用 5%（*V*/*V*）二甲基二氯硅烷（Sigma）/$CHCl_3$ 沾湿 Kimwipe 纸巾在玻板的一面仔细擦拭，涂层干燥后，再用 70%乙醇或异丙醇湿润玻板，然后用 Kimwipe 纸巾拭干。检查玻板上有无灰尘或者其他颗粒。
2. 根据操作手册装好胶板，将硅化的一面朝内放置。插入 0.2～0.4mm 同一厚度的边条，用大号书夹固定好，确保每一边和底部都紧紧固定在一起。
3. 在 100ml 烧杯中准备 60ml 需要的变性丙烯酰胺胶溶液（可选的，在加入 TEMED 之前，可以在 55℃以下加热使尿素迅速溶解，然后冷却到室温）。充分地混匀 60μl TEMED，然后加入 0.6ml 10%过硫酸铵到变性丙烯酰胺胶溶液，立即准备倒胶。
4. 立即倒胶。轻轻地把丙烯酰胺溶液倒入到一个 60ml 注射器中，避免气泡。将短板置于上方，将板呈 45°倾斜放置，从一边慢慢地将胶注入到两板之间，调整板子的角度使得胶溶液慢慢地从一边流到底。
5. 如果溶液已经达到短板的顶部，将胶三明治下移，使得距离上方保留约 5cm 的距离。放一个空的装一次性移液器吸头的盒子或者塞子于胶三明治的下方，保持这个角度。在溶液中插入 0.2～0.4mm 鲨鱼齿梳子的平的一面，插入到短板下方的 2～3mm 处，小心避免气泡。或者，在溶液中插入成形梳子，用大号书夹夹紧板子和中间的梳子，保证在板子和梳子之间不会形成固体的胶。再额外加入一层胶确保完全覆盖。用水

涮去丙烯酰胺。

6. 凝胶聚合后，去掉凝胶三明治底部的边条和透明胶带。用安全刀片切掉梳孔外多余的凝胶，用水洗去板子外面表面黏附的溢出的尿素和凝胶。轻轻拔出鲨鱼齿梳子，不要破坏凝胶顶部。用水清洗梳子准备好在第8步时可以重新使用。如果使用的是成形梳子，小心地撤去，这些梳子是不能重复使用的。
7. 在电泳仪的底部水槽注入1×TBE缓冲液，使得凝胶板底部的2～3cm浸没在缓冲液中。把凝胶三明治放到电泳仪中，板子夹上放好。把注射器套上弯曲的20G针头注入缓冲液，将所有凝胶底部的气泡赶出。
8. 在上方水槽中倒入1×TBE电泳缓冲液至胶面上约3cm处。用巴斯德吸管蘸取1×TBE缓冲液润洗凝胶顶部，重新把干净的鲨鱼齿梳子插入胶三明治，仅仅黏到凝胶即可。用巴斯德吸管蘸取1×TBE缓冲液充分润洗胶孔，洗去碎胶。如果使用的是成形梳子则可以省去这一步。
9. 将供电源设置到45V/cm，1700V，70W恒定电流，使凝胶预热30min。在上样前用1×TBE缓冲液润洗上样孔，冲洗掉渗出的尿素。将样品在带盖小离心管里于95℃加热2min，然后置于冰上，每孔上样量为2～3μl，每次从反应管中取样后要把测序用移液器尖在电泳仪下方水槽中润洗。
10. 在45～70W的恒定电流下跑胶：保持胶的温度大约在65℃，观察marker染料指示带的迁移（表A.3F.1），决定电泳时间。

表A.3F.1　染料迁移率相对寡核苷酸长度

聚丙烯酰胺	溴酚蓝	二甲苯青
5%	35b	130b
6%	26b	106b
8%	19b	75b
10%	12b	55b

温度高于65℃会导致板子裂开或者smeared带；太低的温度则会导致变性不完全。为了保持在电泳时热传导的一致性，通常夹一块铝板（0.4cm厚，34cm×22cm）到前一片玻璃板上，用通常固定用的那种大号书夹，铝板在放置时不能在电泳期间接触电泳缓冲液。

11. （如果有必要）在干胶仪中充干冰，而且预热到80℃。
12. 电泳完成后，从电泳仪的上水槽和下水槽中吸出电泳缓冲液，作为放射性垃圾弃去液体。从电泳仪上取下凝胶三明治，放在自来水管下冲洗，直到两面玻璃板都充分的冷却。将凝胶三明治平放在纸巾上，短玻璃板朝上。去掉多余的液体，但是保持夹子和透明胶带。去掉一边的边条，在放边条的地方插入一个长的金属铲，轻轻摇动，撬开两面玻板（凝胶应该黏附在长玻璃板的一面，如果黏到了短玻璃板一面，将三明治翻转过来）。用插入的金属铲慢慢举起上方的那块板，逐渐增大角度直到完全地与胶面分离。
13. 一旦玻板分开，去除另外一个胶条和凝胶周围多余的丙烯酰胺，将两片干燥的46cm×57cm吸水纸合二为一。从胶的一面起缓慢移向另外一边，使纸覆盖在胶的

表面，要在纸和胶之间制造气泡。揭起吸水纸，凝胶应该一同被揭起，逐渐地卷起纸和胶从玻板上分离。

14. 把纸和胶放到预热过的干胶仪上：表面盖上塑料纸。用 Kimwipe 纸巾从中间向边缘从表面轻轻刮过，除去所有塑料纸和胶之间的气泡，在 80℃干胶 20min～1h（当胶完全干燥，塑料纸会很容易从上面撕下来）。
15. 除去塑料纸，将干胶放到放有 Kodak XAR-5 底片的 X-ray 盒中，胶直接接触底片，室温下放射自显影，充分曝光后（通常需要过夜），拿走底片处理。

编者：Lisa M. Albright and Barton E. Slatko

附录 3G　Southern 杂交法分析 DNA

基本方案

材料（标√的条目参见附录 1）

琼脂糖，电泳级（不建议使用低熔点琼脂糖做杂交分析）
√电泳缓冲液：TAE 缓冲液 或 TBE 缓冲液（见各自的配方）
√10mg/ml 溴化乙锭
DNA 分子质量 marker：如 λ 噬菌体被 *Hin* dⅢ 酶切产生的 23.13、9.42、6.56、4.36、2.32、2.03、0.56 和 0.13kb 片段（保存在 4℃）
样品 DNA
√10×载样缓冲液
√变性溶液
√中性溶液
√20×和 2×SSC
√杂交 cocktail，42℃
√2mg/ml 鲑精 DNA
10^8～10^9cpm/μg 标记的单链 DNA 探针（附录 3E）
√2×SSC/0.1%（*m*/*V*）SDS（见各自配方）
√0.2×SSC/0.1%（*m*/*V*）SDS（见各自配方），室温和 65℃
荧光墨水或放射性墨水
√提馏溶液，90℃
凝胶灌制平台
胶梳
水平凝胶电泳仪
DC 电源
UV 透照灯
UV 防护镜和脸罩

带橙色滤镜的偏光玻璃 MP4 相机（Kodak Wratten no. 23A）UV 防护滤片（Kodak Wratten no. 2B）和胶片盒

65℃、90℃、100℃热水浴

玻璃或塑料的盒子和盘子，最好有 3L 容量

两个矩形塑料板子或者玻璃板子，一个宽 20cm，长度足以跨过盘子或者盒子，另一个 20cm×20cm

Whatman 3MM 滤纸，20cm 宽的滚筒和板子

尼龙膜或者纤维素膜，20cm×20cm

真空温箱，80℃

玻璃杂交管或塑料杂交袋

42℃杂交温箱和平台摇床或旋转器

注意：如果使用玻璃杂交罐和杂交温箱，要从同一制造商处购买（如 the Techne Hybridization Oven、VWR Scientific or Fisher）。

1. 按照要求的构造装好灌胶架子和胶梳。如果胶架子不是四面都有边的那种（如底部是开放的），在开放的一边粘上透明胶带封边。

   制作一张约 20cm×20cm 大，0.5～1.0cm 厚的凝胶适于进行 Southern 杂交；需要 250～300ml 琼脂糖。胶梳的梳齿要足够厚、足够深，能够形成 70μl 的孔，但是梳齿和凝胶顶部之间还要有 1～2mm 的距离，这样孔才能保证有一个胶底。

2. 称取适量的电泳级琼脂粉做胶。把琼脂粉倒入一个 500ml 的烧瓶，在其中加入适量的缓冲液（TAE 或者 TBE）至终量。摇匀。在微波炉中以最大火力加热烧瓶 2～3min 溶胶，不时摇动使得充分混匀，但是不要把胶煮开。

   15～25kb 的片段，0.5%（*m*/*V*）胶为合适；2.5～15kb 的片段，1%（*m*/*V*）胶为合适；0.5～2.5kb 的片段，2%（*m*/*V*）胶最为合适。

3. 胶冷却到可以用手触碰的程度（大约 55℃）。加入 25～30μl 的 10mg/ml 的溴化乙锭（终浓度为 1μg/ml），摇匀。将 55℃的琼脂糖胶倒入胶模中成形。保证胶梳以合适的位置插入，直到凝胶变硬成形。

4. 待胶完全变硬（约 45min），小心地拔去胶梳，不要破坏胶孔，从底部去除胶架。将胶留在制胶板底面上。

   凝胶的底部必须是开放的，这样与电泳槽中的电泳缓冲液保持电流流通。但是，胶架两边的透明胶不用去掉，底部和两边的胶架会给凝胶足够的支持力。

   不要用手直接接触凝胶，因为溴化乙锭能导致突变。而且，手上的油脂也会污染凝胶。

5. 将盛有成形的凝胶的制胶板放在电泳槽中，加入与制胶使用的相同的电泳缓冲液（TAE 或者 TBE），注入大约 1cm 高度使得能够完全覆盖住凝胶。

   长时间的电泳过程会导致一些电泳液蒸发。在电泳过程中，如果凝胶暴露在电泳液之外，凝胶就会熔化。

   用来做杂交的凝胶不要和其他质粒 DNA 或者 orphage DNA 电泳的凝胶在同一个电泳仪中进行，因为即使少量的其他质粒 DNA 或者 orphage DNA 也会残留在电泳槽中，形成对杂交用的凝胶的潜在污染。每次使用电泳槽做电泳之前都保证用肥

皂和水洗干净。

保证将电泳槽放置在合适的地方，不会被冲撞，也没有造成电休克的危险。

6. 稀释 1μg DNA 分子质量大小 marker（如用限制性内切核酸酶 *Hin* dⅢ 酶切的噬菌体 DNA）到 20～30μl 水里，加 10×载样缓冲液至终浓度为 1×。用 1×载样缓冲液载样 DNA 样品 10～15μg 到胶孔里，同样的方式在最后一个孔中加入 DNA 分子质量大小 marker。
7. 将电极接到供电装置上。保证靠近凝胶上样孔的一端接上负极，因为 DNA 是向正极迁移的。打开电源，将电压设定为 30～40V。

   电泳槽要盖上制造商提供的盖子，这样会将少其他试验人员遭到电休克的风险，也可以减少电泳液的蒸发。在接通电源开始电泳后，要不时地观察一下电泳情况，确保不会因为电泳液不足引起过热，和保证样品是向正确的方向电泳的。

   对于一块 20cm 的基因组 Southern 杂交用凝胶，40V 是可以使用的最大电压了。更高的电压，尽管可以提高电泳迁移率以节省时间，但是会降低对不同大小的 DNA 片段的分辨率。如果希望杂交的片段大小相同，还要降低电压。
8. 当载样缓冲液中的溴酚蓝染料接近凝胶底部时，关掉电源，从电泳槽中取出凝胶和制胶板。
9. 带上 UV 防护镜和脸罩，给凝胶成像（尽量减少个人在紫外光下暴露的时间）。把凝胶表面朝上放置在干净的 UV 透照灯的台面上，直接让光从下面透过。用肥皂和水冲洗头罩等的表面，保持表面的洁净，不会污染新胶。固定好偏振照相机，镜头向下固定在凝胶表面上方，使用橙色滤镜片和 UV 防护滤片来制造很好的黑白相片。在凝胶近旁放置一个干净的塑料尺帮助测量图片上的距离。
10. 把胶和支架放到一个盒子或者盘子中去。加入 1.5L 变性溶液，室温下，在平台摇床上孵育 30min。再用新鲜的变性溶液这样重复一次，用中性溶液重复两次。

    有些研究者会在变性之前用 0.25mol/l HCl 处理凝胶 30min。酸性水解液能将 DNA 片段水解成更小的片段而不会改变它们在胶上的位置。更小的片段转移到杂交膜上的转移效率更高；这个技术在分析大 DNA 片段时更为有效。
11. 将凝胶从支持物上取下，用水冲洗盒子。在盒子中加入 5～8cm 深度的 20×SSC，然后把一块玻璃尺子或者树脂尺子像搭桥一样横跨过盒子，从纸筒上剪下一块 60cm 的 Whatman 3MM 滤纸，浸泡在 20×SSC 中。把滤纸横跨过尺子搭的桥，保证两边浸没在缓冲液中（图 A. 3G. 1A）。
12. 一个 10ml 移液器枪头在 20×SSC 中润湿后，从滤纸上重重得滚过，赶出滤纸和桥之间所有的气泡（且在以下所有的步骤中注意赶出气泡）。凝胶面朝下的放置在滤纸上滤纸跨过桥的那个位置（图 A. 3G. 1B）。从胶上赶走气泡。
13. 剪下一张和凝胶大小一致的尼龙膜，放在一个干净的玻璃盘子里，倒满水浸泡 5min。

    尼龙膜会更耐用而且可以反复使用。每一种膜可能都有该产品特殊的使用说明。尽量拿住膜上比较少的部分，只用戴着手套的手，或者只用干净的平头镊子去接触。
14. 倒掉水然后将膜浸在 20×SSC 中 10min。将湿膜放置到胶上。去除膜和胶之间的空

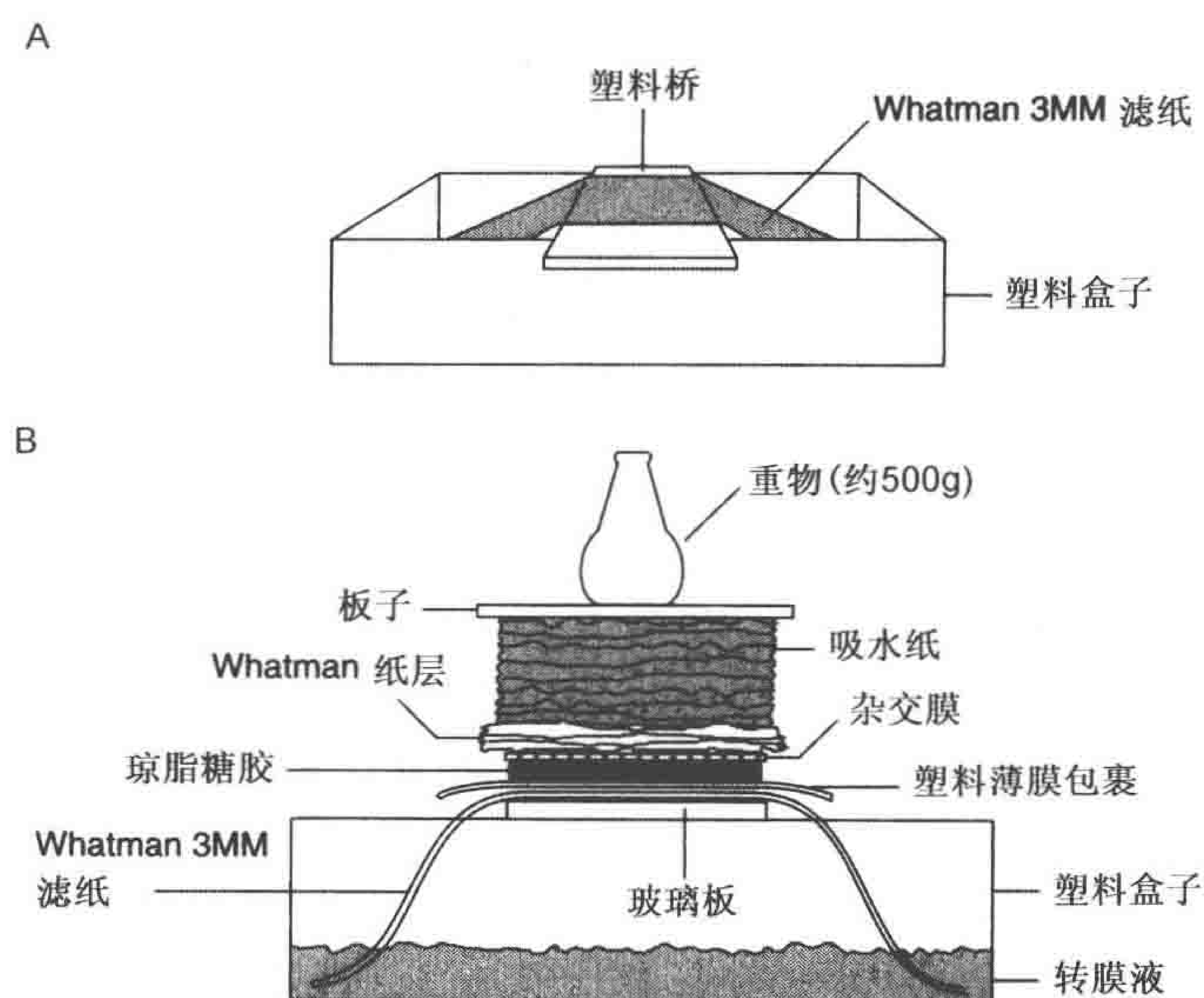


图 A.3G.1 向上毛细管 Southern 转移。(A) 转移中用的塑料盒与一块玻璃板桥接。一张在 20×SSC 中浸泡过的 Whatman 3MM 滤纸搭在桥接处，两端浸入缓冲液中。(B) 完整的转移装置。塑料盒中装中 20×SSC，20×SSC 会通过浸湿的 Whatman 3MM 滤纸产生的毛细管作用穿过胶和膜，并进入上层 Whatman 3MM 滤纸和滤纸堆中。重物可只是装着水的烧瓶，重量应约为 500g。

气泡。把凝胶的一角剪去做识别方向之用（记住此时胶已经被反方向放置）。将 5 块 Whatman 3MM 滤纸也浸泡到 20×SSC 中，一次一片地放到膜的上方，滚动挤出所有气泡。

15. 用塑料薄膜在凝胶的边上裹上一圈。将一垛吸水纸剪成或者折成凝胶的大小，在滤纸上方堆砌大约 10cm 的吸水纸，然后把一块玻璃板或者树脂板盖在吸水纸上，然后在上面放置约 500g 的重物（图 A.3G.1B）。孵育过夜使得 DNA 充分的转移。

    如果吸水纸接触了凝胶上方的滤纸，缓冲液就能穿透整个凝胶（被称作“短路”），凝胶边上的塑料薄膜会阻止短路的发生。

    小片段的 DNA 会比那些大片段的 DNA 更容易发生转移；15～20kb 的 DNA 片段需要转移过夜。在堆积转移之后，可以通过把凝胶放在溴化乙锭中染色后紫外光下观察，检查转移是否完全。

16. 去除重物、玻璃板、吸水纸、滤纸。把凝胶上孔的位置处用软铅笔标记，把膜从凝胶上取走。用 2×SSC 润洗膜，放在吸水纸上 15～30min，空气干燥。待膜完全干透，把尼龙膜在真空烘烤 2h，使得 DNA 完全结合到膜上。将尼龙膜用透紫外光的塑料薄膜包裹好，紫外灯下曝光约 2min，使得凝胶上的各个角落都得到充分且均等的曝光。立即杂交，或者存放在一叠滤纸中干燥保存，可在室温下存放数月。

17. 用 2×SSC 湿润薄膜，然后把薄膜放到玻璃杂交管中。于 42℃加入 10ml 杂交 cocktail，放置在 42℃杂交炉中的转鼓上预杂交 1h。另外一种可选方案是在一个耐热的足以使凝胶展平放置的塑料杂交袋中进行杂交。对于使用杂交袋的方法，用到约 40ml 杂交 cocktail。加入探针，杂交袋封口，去除气泡非常重要。

18. 把薄膜放到玻璃管中旋紧盖子，每 100cm² 的薄膜加入 2ml 的 2mg/ml 鲑鱼精子 DNA 和约 10^7 cpm 标记的 DNA 探针。将混合物煮 10min 变性，然后置于冰上。将探针加入到杂交容器中封口。42℃孵育过夜，转动（管子）过夜或者振动（薄膜）过夜，保证薄膜上的每一部分都可以充分地暴露在探针中。
19. 将杂交 cocktail（和随后的所有洗液）都作为放射性垃圾处理掉。加入 40ml 的 2×SSC/0.1% SDS，室温下以摇动或者振动的方式孵育 15min。再以新鲜的 2×SSC/0.1% SDS 洗一次。不要干膜。

    如果使用杂交管，洗的步骤就在管子里进行。如果使用杂交袋，要把膜用镊子取出，在一个平底的容器（如一个烘干的皿）中进行，倒入充足的洗脱液（足以覆盖住整张膜的，通常是 500～1000ml）。
20. 更换 0.2×SSC/0.1% SDS 洗脱液，室温下孵育 15min。然后再 0.2×SSC/0.1% SDS，在一个 65℃温箱或者 65℃热水浴中孵育 15min。再用新的 65℃的 0.2×SSC/0.1% SDS 再洗一遍。

    探针与膜上未知序列的杂交会被降低盐离子浓度或者升高洗脱液温度而降低。对于一个给定探针，通常需要试验摸索出最适洗脱条件。对于一些探针，可能会很难找到这个既能去除非特异性条带又不会去除有用条带的洗脱条件。最常用的修改方法是调整最终洗脱用的温度。
21. 丢弃最后一次使用的洗脱液。吸去膜上的水分但是又不要让它干燥。用镊子把膜 DNA 面朝上地放到一张剪成 20cm×20cm 的废旧 X-ray 底片上。把膜和底片一起用塑料薄膜包裹起来，不要留缝。用荧光笔或者放射性墨水笔在包好的膜的一角做标记，在底片上也做一个标记，表示出底片相对膜的方向。在暗室中，将底片面朝上地放置在一个空的底片盒中，盖上一张 X-ray 底片（如 Kodak X-Omat R）。底片上放上一张增感屏，关上盒子，－70℃曝光 24～48h。
22. 在暗室中打开盒子，冲洗底片（最好使用自动冲洗设备）。达到最佳曝光时间之后，拿掉薄膜，用记号笔在底片上（依据膜上的标记）标记胶孔的位置。
23. 从塑料薄膜和防光晕层中取下膜（不要干膜）放到 90℃的提留溶液中。90℃孵育 15min。确保所有的探针都已经被去除，再次用 X-ray 底片曝光，如果还有信号，再次提留，或者使用更强烈的方法（如 NaOH）。可以立即再次使用膜，或者用滤纸包好在室温下保存。

参考文献：Southern，1975

编者：John Jarcho

附录 3H　Northern 杂交分析 RNA

注意：为抑制 RNA 酶的活性，用于 Northern 杂交的所有溶液都应该用经过 DEPC（附录 1）处理的无菌去离子水配制。

基本方案 经甲醛-琼脂糖凝胶电泳法分离的RNA进行Northern杂交

材料（标√的条目参见附录1）

√10×MOPS电泳缓冲液
12.3mol/L（37%）甲醛，pH>4.0
RNA样品：细胞总RNA或者poly（A）$^+$RNA
甲酰胺
√甲醛上样缓冲液
染色液（任选一个）
√含和不含0.5μg/ml溴化乙锭的0.5mol/L乙酸铵
√含和不含10μg/ml吖啶橙的1.1mol/L甲醛/10mmol/L磷酸钠（pH7.0；附录1中的磷酸钠）
0.05mol/L NaOH/1.5mol/L NaCl
√0.5mol/L Tris·Cl（pH7.4）/1.5mol/L NaCl（附录1中的Tris·Cl）
√20×SSC
√0.03%（*m/V*）亚甲蓝，溶于0.3mol/L乙酸钠，pH5.2（可选，见附录1中的乙酸钠）
合适的DNA探针
√含甲酰胺的预杂交/杂交（FPH）溶液
√2×SSC、0.2×SSC和0.1×SSC，溶于0.1%（*m/V*）SDS
√探针洗脱液
√无RNA酶的玻璃盘（见附录1中的DEPC处理）
紫外透射仪（经校准）
尼龙膜或者硝酸纤维素膜
杂交管或可加热封口的杂交塑料袋
65℃、80℃和100℃水浴
装膜的塑料盘
用于放射性自显影的X光底片和盒子
Whatman 3MM滤纸
真空干燥箱
可透过紫外线的塑料膜（如Saran膜或其他聚偏乙烯膜）
放射性射线探测器

1. 制备1%琼脂糖凝胶。先将1.0g琼脂糖溶于72ml水中，冷却到60℃，再加入10ml 10×MOPS电泳缓冲液和18ml 12.3mol/L甲醛。让凝胶凝固。将凝胶放入电泳槽中，加入1×MOPS电泳缓冲液，使溶液深度超过凝胶表面约1mm。

   需要一个测量的方法。凝胶厚度应该为2～6mm，上样孔能装下60μl样品。应该留有足够的上样孔，以便于上重复样。

   警告：甲醛是有毒的，不可皮肤接触甲醛和吸入甲醛的气体。对甲醛的所有操

作都应该在通风橱中进行。

2. 用水调整 RNA 样品（每个泳道 0.5～10μg）的体积至 11μl，随后加入：
   5μl 10×MOPS 电泳缓冲液；
   9μl 12.3mol/L 甲醛；
   25μl 甲酰胺；
   涡旋振荡混匀，点离（5～10s），55℃温育 15min。
3. 加入 10μl 甲醛上样缓冲液，涡旋振荡，点离，上样，一个样品一个孔。5V/cm 恒压电泳。当溴酚蓝电泳至凝胶的 1/2～2/3 处时（约 3h），停止电泳。

   在总 RNA 凝胶电泳中经常不使用 size marker，因为 rRNA 分子可被深染，故可以相当于一个内部的 marker。如果分离了 poly（A）$^+$ RNA，可用商业化的 RNA marker（如 0.24～9.5kb RNA ladder；Life Technologies）。

4a. 用溴化乙锭染色：移出凝胶，切下一个重复样品的电泳泳道，移入一个装有无 RNA 酶的 0.5mol/L 乙酸铵的玻璃盘中，洗两次，每次 20min。倒掉洗液，换为 0.5μg/ml 溴化乙锭溶液（溶于 0.5mol/L 乙酸铵中），染色 40min。如果需要，用 0.5mol/L 乙酸铵溶液脱色约 1h。

4b. 用吖啶橙染色：移出凝胶，切下一个重复样的泳道，用 10μg/ml 吖啶橙（溶于 1.1mol/L 甲醛/10mmol/L 磷酸钠）染色 2min。如需要，用无吖啶橙的相同溶液脱色 20min。

5. 用紫外透射仪观察 RNA，将尺子放在凝胶旁，拍照，这样 RNA 转移到膜上后，可以确定位置。
6. 将未染色的胶放入一个无 RNA 酶的玻璃盘中，去离子水洗几次，然后执行以下操作：

   10 倍胶体积的 0.05mol/L NaOH/1.5mol/L NaCl（部分水解）洗 30min；

   10 倍胶体积的 0.5mol/L Tris · Cl（pH 7.4）/1.5mol/L NaCl（中性），洗 20min；

   10 倍胶体积的 20×SSC 洗 45min。

7. 设置如同 Southern 杂交（附录 3G）的转膜装置，转膜过夜。
8. 揭开盖在膜上的纸，弄平凝胶。用铅笔在膜上点样孔的位置作记号，确保膜的上下和前后可以被识别（如切掉膜的一个角）。2×SSC 中漂洗膜，在一张 Whatman 纸上晾干。
9. 将膜放入 2 张 Whatman 3MM 滤纸中间，放入 80℃真空烤箱中烤 2h，以固定膜。如果是尼龙膜，可将干膜用的可透紫外线的塑料膜包被，将有 RNA 的一面对着紫外透射仪（254nm），照射合适长度的时间（附录 3G）。
10. 如需要，可用溴化乙锭和吖啶橙将凝胶染色，检查转膜的效率（第 4 步）。或者，如果是尼龙膜，可用 0.03%（*m/V*）亚甲蓝（溶于 0.3M 乙酸钠，pH5.2）染色 45s，清水脱色 2min。
11. 准备 RNA 或 DNA 探针（附录 3E），理想长度为 100～1000bp，放射性标记至活性 $>10^8$ dpm/μg。除去未整合入探针的核苷酸（附录 3E）。
12. 在 6×SSC 中液相杂交，在杂交管或可加热封口的塑料袋中，将膜上有 RNA 的一

面对着杂交液，每 $10cm^2$ 膜加入约 1ml FPH 溶液。42℃（DNA 探针）或 60℃（RNA 探针）旋转温育 3h。如果是尼龙膜，缩短时间至 15min。

13. 如果探针是双链的，100℃水浴 10min 变性，冰上冷却。
14. 加探针至杂交管或杂交袋中。如果特异活性是 10^8 dpm/μg，加探针至终浓度为 10ng/ml。如果特异活性是 10^9 dpm/μg，加探针至终浓度为 2ng/ml。温育过夜。
15. 倒掉杂交液。如果杂交在杂交袋中进行，将膜移至一个装有洗涤液的塑料盘中，按下面的方法洗膜：

    1 倍体积的 2×SSC/0.1%SDS，每次 5min，洗两次；

    1 倍体积的 0.2×SSC/0.1%SDS，每次 5min，洗两次（低强度洗涤）；

    预热至 42℃的 0.2×SSC/0.1%SDS，每次 15min，洗两次（中强度洗涤；可选择）；

    预热至 68℃的 0.1×SSC/0.1%SDS，每次 15min，洗两次（高强度洗涤；可选择）。
16. 用 2×SSC 室温下漂洗膜，吸干多余的液体，盖上可透紫外线的塑料膜，进行放射性自显影。
17. 将膜放入装有不含甲酰胺的探针洗脱液的杂交袋或开口容器中（液体须盖过膜的表面）。将杂交袋用 80℃水浴 5min。倒掉杂交袋中的液体，洗膜 3 或 4 次。
18. 检测放射性。如果需要进一步使用滤膜，将膜放入装有新鲜探针洗脱液的杂交袋中，沸水浴 5min。倒掉袋中的液体，重复洗膜 3 或 4 次。
19. 检测放射性。如果需要进一步洗膜，将膜放入装有含甲酰胺的新鲜探针洗脱液的杂交袋中。65℃水浴 5min，倒掉袋中的液体，甲酰胺重复洗膜 3 次，再用不含甲酰胺的洗脱液洗 1 次。
20. 将膜放在滤纸上，吸干多余的液体。用塑料袋包好膜，进行放射性自显影或化学发光检测，证实探针已被洗掉。

参考文献：Alwine *et al*.，1977；Thomas，1980

编者：Terry Brown and Karol Mackey

附录 3I　哺乳动物细胞组织培养技术

无菌技术

在实验室操作的所有细胞都有造成感染的可能，操作应该小心谨慎。相应保护措施在必要的时候应该使用，如手套、实验用外套或围裙、眼罩等。在使用锋利的器械，如针、剪刀、手术刀片、可能刺穿皮肤的玻璃时，应该加倍小心。使用一次性无菌塑料制品可以避免器皿破裂产生锋利的玻璃碎片。

通常实验室收到的样品不是无菌的，用这些样品进行培养可能会造成细菌、真菌或酵母污染。固态的组织（如皮肤活检样品和受孕的产物）（单元 8.3）可以在进行培养之前，使用抗生素/抗真菌溶液来进行洗涤，以此防止培养时可能造成的污染。另外，抗生素（青霉素、链霉素、卡那霉素或庆大霉素）和抗真菌药（两性霉素 B 或制霉菌素）可以加到组织培养基中来预防污染（表 A.3I.1）。抗生素/抗真菌药溶液或粉剂，

含有青霉素、链霉素和两性霉素 B，可以从 Sigma 或其他公司获得。这些溶液可以在培养前用于冲洗样品，也可以加到培养基中。

表 A.31.1 哺乳动物细胞培养中使用抗生素和抗真菌药物的工作浓度

添加药物	终浓度
青霉素	50～100U/ml
硫酸链霉素	50～100μg/ml
卡那霉素	100μg/ml
庆大霉素	50μg/ml
抗霉菌素	20μg/ml
两性霉素 B	0.25μg/ml

所有直接接触培养物的材料都必须是无菌的。一次性无菌培养皿、瓶、移液管等都可以从厂家直接获得。重复使用的玻璃器皿在使用前必须彻底清洗、高压蒸汽灭菌或干热灭菌。如使用干热灭菌，玻璃器皿应该在 160℃干烤 90min～2h 以确保无菌。那些高温容易损害的材料可以使用高压蒸汽灭菌，120℃，15psi（1psi＝6.89476×10^3Pa），20min。所有培养基、试剂或其他接触培养物的溶液都必须是无菌的。无菌的培养基可以从厂家直接获得，热敏感的物质可以通过高压蒸汽灭菌或过滤灭菌。补充物应该在过滤之前加进培养基中，或直接加入无菌的补充物。应该使用 0.20～0.22μm 孔径大小的滤器来进行过滤，以除去培养基和溶液中小的革兰氏阴性菌。

细胞培养的任何步骤都可能出现污染，因此在吸取培养基或其他细胞培养用液时都应该小心。细胞培养的瓶子和 flask 瓶颈、移液器用 tip 在进入细胞培养瓶操作前都应该经过酒精灯火焰。如果移液器所用 tip 接触到了瓶口或者非无菌的表面，应该丢弃 tip，重新使用新的。组织培样所用的 Froceps 和剪刀可以通过喷洒 70%的乙醇并燃烧来进行无菌处理。

如果严格按照无菌原则来进行操作，组织培养可以在开放的操作台中进行。但推荐使用生物安全级别的通风橱，以此保护操作者和其他实验人员。使用空气层流系统，气流可以使得操作区域远离灰尘和污染，同时也可以在操作者和操作表面之间起到一个屏障作用。不同类型的安全层流罩都可以使用，实验室应该根据所要处理样品的类型和操作中可能致病的类型来对使用何种层流罩进行一个选择。应该根据厂家建议来对气流和过滤器进行日常的维护。如果每天都使用通风橱，在每次使用前都应该先开启通风橱至少 5min。层流罩的工作表面无论是里面还是外面在每次使用后都应该保持清洁，进行消毒处理。

一些安全橱都装有紫外灯来净化操作表面。虽然有些实验室已经使用紫外灯结合擦拭酒精灯来净化操作区域，然而，操作表面应该使用乙醇来进行擦拭而不能只是仅仅依赖紫外灯。使用特殊的检测装置来检测紫外灯的输出，如果紫外灯的输出达不到起保护作用的最低需求，那么应该对紫外灯进行及时更换。

应该对培养物质进行日常的污染检测。当出现污染时，培养基的颜色会发生改变。污染时，因为酸性物质增多培养基中的酚红会变成黄色。在培养基污染的情况下，也能

观察到云雾状和混浊。一旦通过显微镜确认了培养基已经污染，培养的物质通常应该丢弃。如果继续培养，那么会增加其他培养物的污染机会。有时污染的细胞也能够通过同时使用抗生素和抗真菌药消除污染来抢救细胞。然而，如此处理可能对细胞的生长产生不利的影响，也经常不能够根除污染。

培养基的配制

粉末培养基必须根据厂家提供的说明使用组织培养级别的水来进行配制。对于配制高质量的培养蒸馏水或者去离子水并不是充分的；应该使用双蒸馏水或三蒸馏水及商业化的组织培养水。培养基应该进行过滤除菌并装入无菌的瓶子中，配制好的培养基能够在4℃冰箱存放≤1个月。大量使用培养基的实验室可以选择按照标准的配方来自己配制培养基。基本培养基，如Eagle minimal essential mediun（MEM）、Dulbeccos modified Eagle medium（DMEM；附录1）、RPMI 1640（附录1）、Chang medium（附录1）和Ham F10 nutrient mixture（如Life Technonlogies）是由氨基酸、葡萄糖、盐、维生素和其他营养物质构成的。在基本培养基中补充L-谷氨酸、抗生素（典型的有青霉素和链霉素硫酸盐）和血清来配制成“完全培养基”。所加血清是按照胎牛血清（FBS）的百分比来加的。有些培养基也补充了抗真菌药、非必需氨基酸和各种生长因子。所补充的物质都应该进行灭菌或过滤，或者在使用前加入无菌的补充物质。

大多数哺乳动物细胞培养基的最佳pH是7.2～7.4。加入所有的补充物质后，必须调整培养基的pH。通常在组织培养液中加入碳酸氢盐和HEPES缓冲液来防止pH的波动，以利于细胞的生长。HEPES可以帮助维持pH的稳定，特别是在非恒定CO_2环境中。

大多数细胞都可以耐受克分子渗透压浓度为260～320mOsm/kg的渗透压。而人血浆的克分子渗透压浓度约为290mOsm/kg，这也是培养人来源细胞所采用的渗透压(Freshney，1993)。

胎牛血清（FBS；也可称为FCS）是最常用的血清，此外还有小牛血清、马血清和人血清等。有少数细胞系可在无血清的培养基下生长（Freshney，1993）。培养基依据各种细胞不同的生长需要，分别补充5%～30%（*V/V*）的血清。血清在使用前一般需要热灭活（35℃，30min～1h），热处理能灭活补体，同时也能减少污染的机会。血清一般冷冻保存，拿来解冻后，需分装保存，按需解冻。FBS存在批号之间的差异。大多数供应商会提供特定批号的样品，在更换批号前，需对更换的批号进行测试，看是否适合细胞生长。通常看血清促进细胞生长的能力是否相同来判断该批号的血清是否适合细胞生长。一旦该批号的血清被肯定，应该购买足够同批号的血清来满足实验室的需要。

许多实验室选择购买不含L-谷氨酸的培养基，而在使用前加终浓度为2mmol/L的L-谷氨酸，但也能够从供应商那获得含有L-谷氨酸的培养基。引起L-谷氨酸降解的因素有温度和pH。为了防止其降解，应该配制100×L-谷氨酸（附录1）分装冻存，按需解冻使用。

另外，为了达到一个很好的无菌条件，大多数实验室选择在培养基中加入抗生素来预防污染。青霉素加链霉素是通常使用的抗生素，另外也有单独使用卡那霉素和庆大霉

素的。通常使用抗霉菌素和两性霉素 B 来抗真菌。表 A.3I.1 列出了通常使用的抗生素和抗真菌药物的终浓度。在组织培养中，抗生素的联合使用有时是很棘手的，因为有些抗生素是不能联合使用的，它们中一个能抑制另一个的活性。另外，抗生素的联合使用相比单独使用一种抗生素其细胞毒性作用的抗生素浓度会更低。同时，长时间使用抗生素可以使细胞产生耐药性。由于以上原因，一些实验室只是在建立细胞培养体系的初期使用抗生素和（或）抗真菌药物，而后续的培养则不使用。

不论是商业化的培养基或者是实验室自己配制的培养基，在使用前都应该进行无菌培养测试。从同一批号的培养基中取一小部分在 37℃ 培养 48h，来观测是否存在污染，如混浊（污染的培养基将有云雾状）和颜色改变（如使用酚红作指示剂，污染的培养基将变成黄色）的培养基只要污染就都应该丢弃。

基本方案　单层贴壁细胞的胰酶消化和传代

材料（标√的条目参见附录 1）

原代培养的细胞

√无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 HBSS，37℃

√0.25%（*m*/*V*）胰酶/EDTA 溶液，37℃

√含 10%～15%胎牛血清的完全 DMEM 或 RPMI，37℃

无菌塑料移液管

37℃ 加热箱或培养箱

组织培养用的塑料器皿或玻璃器皿，包括移液管、25cm² 的培养瓶或 60mm 直径的细胞培养皿，无菌

注：除非其他特殊要求，细胞培养应该在 37℃，5%CO_2 培养箱中培养。

1. 使用无菌的塑料移液管从原代培养细胞中吸取培养基。用 37℃不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 HBSS 洗单层贴壁细胞 1 或 2 次，洗去残留的 FBS 防止其抑制胰酶的活性。如果细胞是第一次更换培养基，不要丢弃原代细胞的培养基，可以把这些培养基置于新的培养皿或培养瓶中，因为这些培养基中含有还未贴壁的细胞，这些细胞可以重新贴壁和生长。
2. 加入 37℃胰酶/EDTA 溶液，溶液要足以覆盖贴壁细胞。把细胞培养皿置于 37℃ 加热箱中 1～2min。轻打培养皿的底部来移动细胞，在倒置显微镜下观察细胞是否变圆以及是否与培养皿表面分离。如果细胞分离不是很完全，可以重新把培养皿置于加热箱中处理 1～2min。
3. 加 2ml 37℃的完全培养基。吸取细胞悬浮液到塑料移液管中，吹打细胞 2 或 3 次，使细胞分离，吹散任何维持黏附的细胞。细胞一吹散就马上加入血清或包含血清的培养基来抑制胰酶的活性，因为胰酶的进一步活性可能对细胞有损害。如果是按照 1/3 或 1/4 而不是 1/2 来进行传代。那么有充足的培养基转移到每个新的细胞培养器皿中，如可以有 1ml 细胞悬液。
4. 在标有患者名字、实验室标记号、传代日期和传代次数的新的培养皿或培养瓶中，加入等体积的细胞悬液。

可以选择使用血细胞计数器或计数板来对细胞进行计数，稀释成想要的密度，如此以来每个培养器皿中可以加入特定数目的细胞。通常传代时，细胞的浓度维持在大约 5×10^4 个细胞/ml。

对于原代培养或早期的细胞传代，通常使用 60mm 直径的细胞培养皿或 $25cm^2$ 的培养瓶来进行培养，较大的培养皿或培养瓶（如 150mm 直径的培养皿或 $75cm^2$ 的培养瓶）一般在后期的传代中使用。

5. 每个新的培养器皿中加入 4ml 培养基（如果使用 $75cm^2$ 的培养瓶则加入 9ml）。在 37℃，5%CO_2 培养箱中培养。如果有必要，未长满的细胞，在 3～4 天后更换培养基，加入新鲜的 37℃培养基。如果细胞长满，重复第 1～4 步来进行第二次传代和持续传代。

支持方案 1　单层培养人类细胞的冻存

材料（标√的条目参见附录 1）

原代培养的细胞
细胞培养皿中处于对数增殖期的单层细胞
√完全 DMEM 或 RPMI
冻存培养基：完全培养基 + 10%～20%（*V/V*）FBS + 5%～10%（*V/V*）DMSO，4℃
液氮

1. 用胰酶消化同一批培养的细胞。加 2ml 完全培养基终止消化，将细胞悬液转移至无菌的离心管中。室温 300～350*g* 离心 5min。
2. 去掉上清，加 1ml（约 $3ml/cm^2$ 培养瓶的细胞）4℃预冷的冻存培养基，重悬。加 4ml 4℃预冷的冻存培养基，充分混匀。用血细胞计数板计数。用冻存培养基将细胞悬液浓度稀释成 10^6 个或 10^7 个细胞/ml。
3. 吸取 1ml 细胞悬液至 2ml 冻存管中，将冻存管放置−70℃冰箱 1h 至过夜，然后转至液氮中储存。

备选方案　细胞悬液的冻存

细胞悬液的冻存与单层细胞冻存的原理相似。它们最大的不同是不需要经胰酶处理。材料方法参照支持方案 1。

1. 将细胞悬液转移至离心管中，室温下 300～350*g* 离心 10min。去掉上清并用 4℃预冷的冻存培养基重悬，10^6～10^7 个细胞/ml。

   一些实验室冻存类淋巴母细胞时采用高密度冻存。因为它们复苏时需要大量的培养基，并且与其他类型的细胞比较，复苏后大量的细胞有可能会损失。

2. 与单层细胞一样，取出 1ml 的细胞悬液放入冻存管中并冻存。

支持方案 2　解冻和复苏人的细胞

当需要研究冻存的细胞时，它们解冻后必须高密度种植以利于它们生长。

注意： 当从液氮罐中取出冻存管时必须穿戴防护衣、手套和护目镜。液氮罐存储室必须通风。要小心提取，不要使液氮碰到皮肤。

材料

冻存细胞（见支持方案 1 或备选方案）

70%（V/V）乙醇

√37℃预温的含 20%FBS 的完全培养基

注意： 所有培养箱为潮湿的 37℃，5%CO_2 培养箱，除非特别指定。

1. 将冻存管从液氮罐中取出，放入 37℃水浴箱中迅速摇动至培养基融解（通常小于 60s）。

   细胞必须尽可能快的融解以阻止其在复温时形成结晶。水不要漫过冻存管盖。

2. 在打开冻存管前用 70%乙醇喷洗或擦拭，然后空气干燥。
3. 将细胞悬液转入装有 2ml 预温的完全培养基（含 20%FBS）的离心管中。室温 150～200*g* 离心 10min。去上清液。
4. 取少量或 1ml 完全培养基重悬细胞，并转至含有适当培养基（一般是 5～20ml）的适当培养皿内。复苏细胞的接种要比平常的接种密度要高，因为在冻存时有些细胞已死亡。
5. 24h 后检查细胞是否贴壁。当培养基变色、pH 降低时，5～7 天后换液。一直用含 20%FBS 的培养基培养至满瓶。

   如果复苏率很低，只有之前的一部分；使用这些细胞的嵌合体时要额外的注意。

支持方案 3　用血细胞计数板和胎盘蓝染色法计算细胞数和细胞活率

血细胞计数板是一个在中间有计数单元的载玻片，这里描述一下 Baxter 科学仪器公司的改进的 Neubauer（图 A. 3I. 1）。计数板中间部分是一个边界为 1mm 凹槽的计数平台。中间的平台被横向切成两个计数平台。每个计数单元含有一个 3mm×3mm 网格的银白色平板。每个网格又被分成 9 个 1mm×1mm 的小正方格。四个角上和中间的正方格用于细胞计数。四个角上的正方格又被分成更小的 16 个正方格，而中间的正方格则被分成更小的 25 个正方格用于细胞计数。伴随计数板载玻片的还有一个计数专用的盖玻片。普通的盖玻片用于细胞计数会造成计数错误；所以，细胞计数必须用专用的盖玻片。将细胞悬液充值到有意义的地方并计数便能计算出细胞的密度。

材料

70%（V/V）乙醇

细胞悬液

√含 0.4%（*m*/*V*）台盼蓝或 0.4%（*m*/*V*）苯胺黑的 HBSS

人血细胞计数板和盖玻片（Improved Neubauer，Baxter Scientific）

计数器

1. 用 70%乙醇清洗血细胞计数玻片（改进的 Neubauer）和盖玻片的表面，晾干。盖玻片的湿润的一侧具有轻微的水角膜张力，按压在血细胞计数器的槽上面，所以其他

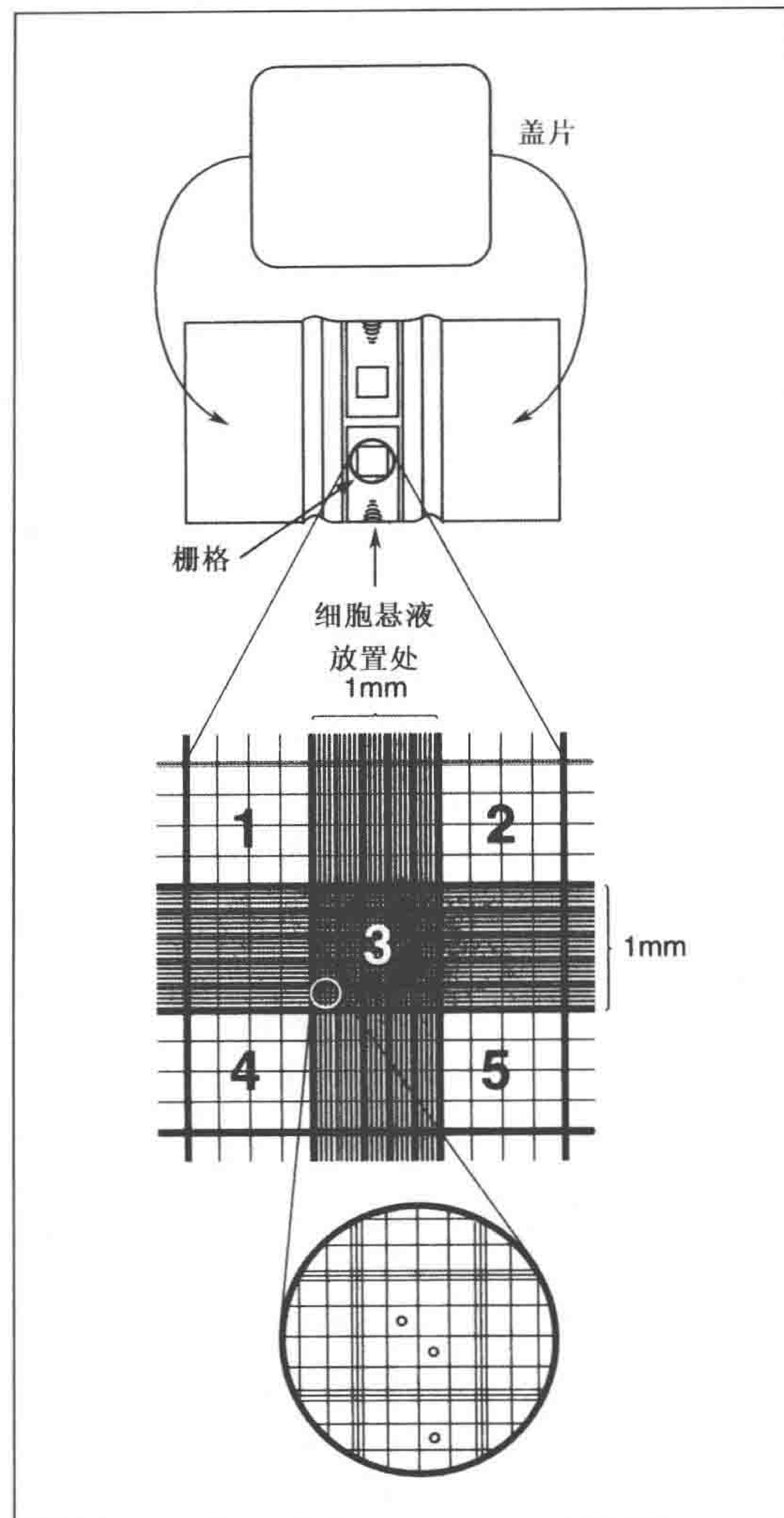


图 A. 3I. 1　血细胞计数玻片（改进的 Neubauer）和盖玻片。适用玻片的盖玻片，用巴斯得移液管将细胞悬液加至计数区。每个计数区含有 3mm×3mm 的网格（被扩大）。每次血细胞计数都需要计数 4 个角落区（1、2、4 和 5）和中心区（3）（把所有数值相加）。

部分最终置于银计数区上。

2. 对于贴壁细胞而言，参照基本方案用台盼蓝除去皿表面的细胞。按所需稀释细胞以获得浓度一致的悬液（推荐血细胞计数器的每 1mm 区间最多含有 20～50 个细胞）。分布弥散。
3. 用无菌的巴斯得移液管将细胞悬液打至血细胞计数器的计数区。将移液器的尖端置于盖玻片下，打入一滴悬液，通过毛细作用拉至盖玻片下方。

   血细胞计数器是有菌的，如果细胞悬液需要用于培养，不要重复用移液器且不要将移液器中多余的细胞悬液放回最初的悬液中。
4. 充满第二个计数区。开始计数前将细胞沉降一定时间。吸去多余的液体。在 100×显

微镜下观察玻片（如 10×目镜和 10×物镜）。将玻片放置于可见大面积网格中心区的位置（图 A. 3I. 1 第 3 区）。这一区域的边缘由一系列的三条平行线构成。

网格的中心区应该在显微镜的视野区域。大面积中心区域也被三条平行线细分，且每个细分处都用单线分成 16 个小区域。该处的细胞需要完全分散地分布。如果细胞分散不均，洗净后重新计数。

5. 用计算器计算每个角落和中心区域的细胞数（图 A. 3I. 1 中的 1～5 区）。重复计数其他计数区。

两个计数区中每个计数区中有 5 个小区，总共计数了 10 个小区。按照“数上不数下，数左不数右的原则”计数。

6. 通过下面的计算确定每毫升所含细胞数：

$$\text{细胞个数/ml} = \text{每小区细胞的平均数} \times \text{稀释倍数} \times 10^4$$

$$\text{总细胞数} = \text{细胞个数/ml} \times \text{样本所在悬液的原始体积}$$

10^4 是血细胞计数器的体积校正因子：每小区为 1mm×1mm 且高度为 1mm。

7. 确定活细胞数。将 0.5ml 浓度 0.4%的台盼蓝（或 0.4%的苯胺黑）、0.3ml HBSS 和 0.1ml 细胞悬液置于小管中。彻底混匀，上血细胞计数器前静置 5min。计总细胞数和活细胞（未染色）数。按如下公式计算活细胞率：

$$\text{活细胞率}\% = \frac{\text{未染色细胞}}{\text{总细胞}} \times 100$$

8. 用 70%乙醇冲洗盖玻片和血细胞计数器，消毒完后，用去离子水洗。自然干燥后保存。

支持方案 4　准备用于转化的细胞

单层和悬浮细胞都可以装至 $25cm^2$ 组织培养瓶中培养。细胞逐渐生长汇合成单层细胞或在悬液中达到所需的密度。将培养基从贴壁细胞培养瓶中吸出后加入新鲜培养基。悬浮细胞则直接将新鲜培养基加入到悬液中。在运输的过程中要将培养基装满培养瓶以防止培养瓶被倒置而导致细胞受损。盖子旋紧，且固定在安全的位置。培养瓶装在经过防漏测试的封闭的塑料袋或其他塑料容器中以防止泄漏造成培养瓶的损坏。第一个容器放置在第二个绝缘的容器中避免在运输过程中温度过高。生物危害物的标记应附着在外包装上。培养物一般需要运送一定的天数或隔夜。细胞可以冻存。冻存细胞的管子从液氮罐中拿出来后立即放于装有干冰的绝缘容器中以防止运输过程中融化。

参考文献：Lee，1991

编者：Mary C. Phelan

附录 3J　通过 EB 病毒转化建立恒定的细胞系

注意：所有与活细胞接触的试剂和设备都必须是无菌的。所有培养一般都需要在潮湿 37℃，5% CO_2 培养箱中培养，除了其他特殊情况。

基本方案　EB 病毒转化培养的淋巴细胞

该方案描述了 EB 病毒转化和培养人类 B 淋巴细胞以建立永生的细胞系，这个细胞系能作为更新的 DNA 资源用于家系基因型分析。

材料（标√的条目参见附录 1）

全血收集至一 8.5ml 黄盖装有 ACD 溶液 A 的 Vacutainer 管
√HBSS 不含 Ca^{2+} 或 Mg^{2+}
√转化培养基，37℃
√生长培养基，37℃
Leuco-prep 管
15ml 锥形离心管，无菌
$25cm^2$ 和 $75cm^2$ 组织培养瓶

1. 从每个患者中收集 2 个 8.5ml Vacutainer 的血液。血液立即使用或在室温下储存最多 3 天，不要保存于 4℃。
2. 将全血转移至 Leuco-prep 管（每个 8.5ml Vacutainer 用一个 16mm×125mm 的管）。室温下 1000g 离心 30min；血液从上到下会形成如下几层——血清、白细胞（WBC）、凝胶层和红细胞（RBC）。
3. 将白细胞层转移至一 15ml 锥形离心管中，加入无 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 的 HBSS 至 10ml，将白细胞悬液在室温下 150g 离心 10min。转移完成后，Leuco-prep 管需当作生物危害物处理。
4. 除去上清后，加入 5ml 无 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 的 HBSS 吹打混匀，150g 离心 10min。除去上清加入 6～8ml 转化培养基吹打混匀细胞，平均分至标记为 A 和 B 的两个 $25cm^2$ 组织培养瓶中。培养前先立式培养 7～10 天。

   形成细胞丛表明生长良好，培养基颜色的改变是由于 pH 的改变，表明细胞需要换液。
5. 一星期后，弃去培养物表面 1.5ml 转化培养基，加入等量生长培养基，再培养一周。每星期加入 0.2ml 新鲜的生长培养基。孵育至培养基变清亮且颜色变黄，可见小细胞丛（两星期后，有 60%～70% 的细胞已经长好）。
6. 加 0.5～1.0ml 新鲜的生长培养基孵育。每 2～3 天检查生长状况。当培养基变黄且细胞丛越来越大，加 3ml 新鲜的生长培养基。下一次加液时则再加入 5ml 新鲜的生长培养基。
7. 当培养基的总容量达到 12～15ml 且细胞可以传代时，转至一 $75cm^2$ 培养瓶中，加入 10ml 新鲜的生长培养基。混匀后吸 2ml 培养基回 $25cm^2$ 培养瓶，用 R（用于保种）标记该瓶并加入 3ml 新鲜的生长培养基。两瓶细胞均培养。继续培养保种的细胞直至细胞株冻存，此时该瓶细胞可以不再培养。
8. 当细胞需要加液时，加入 15ml 新鲜的生长培养基至 $75cm^2$ 培养瓶中。每 2～3 天加液直至 $75cm^2$ 培养瓶中培养基总体积为 50ml。冻存细胞（详见支持方案 1）。

   培养瓶和管需要当作生物危害物处理。

为了获得分离 DNA 所需细胞沉淀（附录 3A），继续培养直至培养基的体积达到 60～70ml。加 10ml 生长培养基混匀后吸出 50ml 细胞悬液至离心管。

用 EB 病毒转化 B 细胞的效率比较低。100 个细胞中大约有 1 个被转化。

推荐保存 5 管永生化的细胞，每管包含 1×10^7～2×10^7 个细胞，便于以后做培养或抽提 DNA。

支持方案 1　EB 病毒株的制备

材料（标√的条目参见附录 1）

被 EB 病毒感染的 B95-8 细胞（ATCC）

√加 10%胎牛血清（附录 1）的完全 Iscove's modified Dlbecco's medium（IMDM）培养基，37℃

25cm² 和 75cm² 细胞的组织培养瓶

50ml 离心管

95% 干冰/乙醇或液氮罐

0.45μm 的过滤器

1. 融化被 EB 病毒感染的 B95-8 细胞，在 25cm² 的培养瓶中加入 3ml 含 10%胎牛血清的完全（IMDM）培养基，卧式培养。
2. 当培养基变黄时加含 10%胎牛血清的完全（IMDM）培养基 3ml，直到达到所需体积。再继续培养 1～2 个星期但不再加培养基，直到培养基变成明亮的柠檬黄色。移至大培养瓶中培养或分至几个培养瓶中，晃动培养瓶使细胞分散后倒出。按上面的标明方法培养。
3. 收获细胞时，将细胞悬液转至一 50ml 离心管。在 95%干冰/乙醇罐中凝固后放进 37℃水浴箱中反复冻融 3 次使细胞裂解，释放病毒。
4. 将悬液以 300g 的速率离心 10min，上清液用 0.45μm 的过滤器过滤。等量分装所需体积保存于液氮或－80℃冰箱，用前解冻。

冻存时等量分成 1ml、5ml 或 50ml 体积，取用时根据需要转化的细胞量来确定解冻合适体积的管子。

EB 病毒按照 Miller 和 Lipman 的算法（1973）计算滴度。冻存管的滴度至少在一年内可以保持稳定。在良好的制备条件下，从 B95-8 细胞上清中分离的 EB 病毒含量都在 10^3 个转化单位/ml。因为 EB 病毒的滴度在制备的过程中是变化的，所以每次制备都需要检测转化能力。一旦冻存在－80℃或更低的温度，这次制备的滴度就可以在至少一年内保持稳定。

支持方案 2　冻存和复苏 EB 病毒转化的淋巴细胞

材料（标√的条目参见附录 1）

EB 病毒转化的淋巴细胞的培养（基本方案）

√冻存培养基

√无血清 RPMI 完全培养基

50ml 离心管

15ml 离心管

1.8ml 冻存管

1. 将 EB 病毒转化的淋巴细胞移至 50ml 离心管。取 0.5ml 细胞于一 15ml 离心管，并用台盼蓝染色确定细胞活率（附录 3I），活率需大于 70%。
2. 将细胞悬液于 300g 离心 15min。弃去上清液后用 5ml 无血清培养基将细胞混匀。每管 1ml 细胞等分至 5 个标记样本数量和时间的冻存管中。

   冻存培养基包含 10% DMSO 作为冻存保护剂，这是细胞复苏所必需的。如果细胞将要用于 DNA 抽提，需要省略 DMSO。如果包含 DMSO 的冻存细胞需要直接用于 DNA 提取，可以在消化细胞之前用等渗的方法洗涤细胞除去 DMSO。

   推荐保存 5 管以上永生化的细胞，每管包含 1×10^7～2×10^7 个细胞，便于以后做培养或抽提 DNA。
3. 将冻存管置于－70℃过夜后，移至液氮储存罐中并记录位置。
4. 复苏细胞时，将管子从冰箱中取出，放于干冰上。将管子转移至 37℃水浴箱，尽可能快地溶解使冰晶的形成减少到最低。每管加入 6～7ml 无血清完全 PRMI 培养基稀释内容物。

   以 300g 的速率离心，时间刚好够松散地吹打细胞。倒掉上清液后，加入 3ml 生长培养基吹打均匀。继续按照基本方案的第 6～8 步培养细胞。

编者：John Gilbert

附录 3K　核型分析

基本方案

第 4 章描述的染色体显带程序可以识别单条染色体，因为每条染色体以独特的条带模式为特征。这个识别过程导致了核型的建立。核型就是单个细胞中的染色体的系统化排列，就是将一个个体或物种的染色体分型（ISCN，1995）。人们已经建立了一个标准的命名体制，根据染色体的大小、性状和显带模式，为每个人类染色体编号。

为确定一个非嵌合体的个体或同质性的细胞系的染色体组成，应该制作一个或两个核型。对于同源嵌合体或异源嵌合体的个体，或者肿瘤和异质性细胞系中的获得性染色体的改变，每个不同的、已确定的染色体组都应最少制作一个核型。额外的分析将取决于最初的发现和分析的目的。根据常规的临床分析，除这些核型外，通过显微镜或照片，通常要完全分析 3 个细胞。另外，应计数最少 15～20 个细胞，以确定细胞中的染色体数目和区分是否有其他的细胞系。对于癌症病例或被转化的细胞系，需要分析更多的细胞，但对于确定以前已经识别出的异常，小量分析就已经足够了。

染色体的识别和确定是一个需要一些经验的技能。一个新手应从正常细胞开始，并请求一个经过训练的细胞遗传学工作者确认核型的正确性。一些基本的要领如下所述。

1. 除了在异型配子性别中的性染色体外，体细胞中的染色体通常以相同的大小和显带

模式成对存在。

2. 染色体根据如下的形状分组：

   中着丝粒染色体——着丝粒位于染色体的中间，两臂等长；

   亚中着丝粒染色体——着丝粒稍偏离中央，一条臂（q）长些；

   近端着丝粒染色体——着丝粒离一端近，一条臂（p）很短；

   端着丝粒染色体——着丝粒位于一端（注意：没有一个人类染色体是端着丝粒染色体）。

3. 人类染色体根据大小分组如下：

   No. 1～3——大的中着丝粒染色体（A 组）；

   No. 4～5——大的亚中着丝粒染色体（B 组）；

   No. 6～12、X——中等大小的亚中着丝粒染色体（C 组）；

   No. 13～15——中等大小的近端着丝粒染色体（D 组）；

   No. 16～18——小的亚中着丝粒染色体（E 组）；

   No. 19～20——小的中着丝粒染色体（F 组）；

   No. 21～22、Y——小的近端着丝粒染色体（G 组）。

4. 染色体以 p 臂（短或小臂）位于上部（在中着丝粒染色体中，这个臂根据习惯选择）。
5. 在组内，参考染色体组型模式图（附录 2B）中的标记。
6. 性染色体可以安排到相关组的后面，或者单独作为一队排列。
7. 可以预料细胞与细胞之间有一些小的变异，这些变异由染色体的不同缢痕（固缩）造成。
8. 多态性导致同质细胞间的差异。在人中，多态性主要发生于染色体的着丝粒区域，位于 1、9 和 16 号染色体异染色质区域——紧靠近于着丝粒；位于近端着丝粒染色体（13、14、15、21 和 22 号染色体）的短臂；位于 Y 染色体的长臂的异染色质。

建立核型的主要步骤如下所述。

1. 计数显带中期细胞的照片上的染色体数目（单元 4.3），确定染色体数目。
2. 采集每个中期染色体的图像。

   如果染色体相互重叠，则需多个复件。

3. 根据大小和形状将染色体分组。
4. 比较显带模式，确定和配对同源染色体。
5. 按顺序排列和固定好成对同源染色体（最大的染色体数目最少），与染色体组型模式图（附录 2B）相比较。

   固定方法：用胶水或者双面胶将染色体图贴在一个成组排列的每对同源染色体的下面标有染色体编号的表格上。

6. 将感兴趣的区域（断裂或杂交位点）定位，根据 ISCN（1995）（附录 2B）中的命名体系中的符号命名。
7. 用标准命名体制（ISCN，1995）描述染色体组。

参考文献：ISCN，1995

编者：Rhona R. Schreck and Christine Distèche

附录4　一些试剂和仪器提供商

以下列出本手册推荐的一些商业提供商的地址和电话号码，这是因为：(1) 特定的品牌被证明是高质量的，或 (2) 一些商品难以在市场上找到。因此，本附录可能没有包括一些重要的生物制品公司。关于详细的目录，请参照 *Linscott's Directory of Immunological and Biological Reagents* (Santa Rosa，CA)、*The Biotechnology Directory* (Stockton Press，New York)、*Bio/Technology* 杂志的附录——年度购买者指南 (the annual Buyers' Guide)，以及互联网上的很多网站。

A.C. Daniels
72-80 Akeman Street
Tring, Hertfordshire, HP23 6AJ, UK
(44) 1442 826881
FAX: (44) 1442 826880

A.D. Instruments
5111 Nations Crossing Road #8
Suite 2
Charlotte, NC 28217
(704) 522-8415　FAX: (704) 527-5005
http://www.us.endress.com

A.J. Buck
11407 Cronhill Drive
Owings Mill, MD 21117
(800) 638-8673　FAX: (410) 581-1809
(410) 581-1800
http://www.ajbuck.com

A.M. Systems
131 Business Park Loop
P.O. Box 850
Carlsborg, WA 98324
(800) 426-1306　FAX: (360) 683-3525
(360) 683-8300
http://www.a-msystems.com

Aaron Medical Industries
7100 30th Avenue North
St. Petersburg, FL 33710
(727) 384-2323　FAX: (727) 347-9144
http://www.aaronmed.com

Abbott Laboratories
100 Abbott Park Road
Abbott Park, IL 60064
(800) 323-9100　FAX: (847) 938-7424
http://www.abbott.com

ABCO Dealers
55 Church Street Central Plaza
Lowell, MA 01852
(800) 462-3326　(978) 459-6101
http://www.lomedco.com/abco.htm

Aber Instruments
5 Science Park
Aberystwyth, Wales SY23 3AH, UK
(44) 1970 636300
FAX: (44) 1970 615455
http://www.aber-instruments.co.uk

ABI Biotechnologies
See Perkin-Elmer

ABI Biotechnology
See Apotex

Access Technologies
Subsidiary of Norfolk Medical
7350 N. Ridgeway
Skokie, IL 60076
(877) 674-7131　FAX: (847) 674-7066
(847) 674-7131
http://www.norfolkaccess.com

Accurate Chemical and Scientific
300 Shames Drive
Westbury, NY 11590
(800) 645-6264　FAX: (516) 997-4948
(516) 333-2221
http://www.accuratechemical.com

AccuScan Instruments
5090 Trabue Road
Columbus, OH 43228
(800) 822-1344　FAX: (614) 878-3560
(614) 878-6644
http://www.accuscan-usa.com

AccuStandard
125 Market Street
New Haven, CT 06513
(800) 442-5290　FAX: (877) 786-5287
http://www.accustandard.com

Ace Glass
1430 NW Boulevard
Vineland, NJ 08360
(800) 223-4524　FAX: (800) 543-6752
(609) 692-3333

ACO Pacific
2604 Read Avenue
Belmont, CA 94002
(650) 595-8588　FAX: (650) 591-2891
http://www.acopacific.com

Acros Organic
See Fisher Scientific

Action Scientific
P.O. Box 1369
Carolina Beach, NC 28428
(910) 458-0401　FAX: (910) 458-0407

AD Instruments
1949 Landings Drive
Mountain View, CA 94043
(888) 965-6040　FAX: (650) 965-9293
(650) 965-9292
http://www.adinstruments.com

Adaptive Biosystems
15 Ribocon Way
Progress Park
Luton, Bedsfordshire LU4 9UR, UK
(44)1 582-597676
FAX: (44)1 582-581495
http://www.adaptive.co.uk

Adobe Systems
1585 Charleston Road
P.O. Box 7900
Mountain View, CA 94039
(800) 833-6687 FAX: (415) 961-3769
(415) 961-4400
http://www.adobe.com

Advanced Bioscience Resources
1516 Oak Street, Suite 303
Alameda, CA 94501
(510) 865-5872 FAX: (510) 865-4090

Advanced Biotechnologies
9108 Guilford Road
Columbia, MD 21046
(800) 426-0764 FAX: (301) 497-9773
(301) 470-3220
http://www.abionline.com

Advanced ChemTech
5609 Fern Valley Road
Louisville, KY 40228
(502) 969-0000
http://www.peptide.com

Advanced Machining and Tooling
9850 Businesspark Avenue
San Diego, CA 92131
(858) 530-0751 FAX: (858) 530-0611
http://www.amtmfg.com

Advanced Magnetics
See PerSeptive Biosystems

Advanced Process Supply
See Naz-Dar-KC Chicago

Advanced Separation Technologies
37 Leslie Court
P.O. Box 297
Whippany, NJ 07981
(973) 428-9080 FAX: (973) 428-0152
http://www.astecusa.com

Advanced Targeting Systems
11175-A Flintkote Avenue
San Diego, CA 92121
(877) 889-2288 FAX: (858) 642-1989
(858) 642-1988
http://www.ATSbio.com

Advent Research Materials
Eynsham, Oxford OX29 4JA, UK
(44) 1865-884440
FAX: (44) 1865-84460
http://www.advent-rm.com

Advet
Industrivagen 24
S-972 54 Lulea, Sweden
(46) 0920-211887
FAX: (46) 0920-13773

Aesculap
1000 Gateway Boulevard
South San Francisco, CA 94080
(800) 282-9000
http://www.aesculap.com

Affinity Chromatography
307 Huntingdon Road
Girton, Cambridge CB3 OJX, UK
(44) 1223 277192
FAX: (44) 1223 277502
http://www.affinity-chrom.com

Affinity Sensors
See Labsystems Affinity Sensors

Affymetrix
3380 Central Expressway
Santa Clara, CA 95051
(408) 731-5000 FAX: (408) 481-0422
(800) 362-2447
http://www.affymetrix.com

Agar Scientific
66a Cambridge Road
Stansted CM24 8DA, UK
(44) 1279-813-519
FAX: (44) 1279-815-106
http://www.agarscientific.com

A/G Technology
101 Hampton Avenue
Needham, MA 02494
(800) AGT-2535 FAX: (781) 449-5786
(781) 449-5774
http://www.agtech.com

Agen Biomedical Limited
11 Durbell Street
P.O. Box 391
Acacia Ridge 4110
Brisbane, Australia
61-7-3370-6300 FAX: 61-7-3370-6370
http://www.agen.com

Agilent Technologies
395 Page Mill Road
P.O. Box 10395
Palo Alto, CA 94306
(650) 752-5000
http://www.agilent.com/chem

Agouron Pharmaceuticals
10350 N. Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037
(858) 622-3000 FAX: (858) 622-3298
http://www.agouron.com

Agracetus
8520 University Green
Middleton, WI 53562
(608) 836-7300 FAX: (608) 836-9710
http://www.monsanto.com

AIDS Research and Reference
Reagent Program
U.S. Department of Health and
Human Services
625 Lofstrand Lane
Rockville, MD 20850
(301) 340-0245 FAX: (301) 340-9245
http://www.aidsreagent.org

AIN Plastics
249 East Sanford Boulevard
P.O. Box 151
Mt. Vernon, NY 10550
(914) 668-6800 FAX: (914) 668-8820
http://www.tincna.com

Air Products and Chemicals
7201 Hamilton Boulevard
Allentown, PA 18195
(800) 345-3148 FAX: (610) 481-4381
(610) 481-6799
http://www.airproducts.com

ALA Scientific Instruments
1100 Shames Drive
Westbury, NY 11590
(516) 997-5780 FAX: (516) 997-0528
http://www.alascience.com

Aladin Enterprises
1255 23rd Avenue
San Francisco, CA 94122
(415) 468-0433 FAX: (415) 468-5607

Aladdin Systems
165 Westridge Drive
Watsonville, CA 95076
(831) 761-6200 FAX: (831) 761-6206
http://www.aladdinsys.com

Alcide
8561 154th Avenue NE
Redmond, WA 98052
(800) 543-2133 FAX: (425) 861-0173
(425) 882-2555
http://www.alcide.com

Aldevron
3233 15th Street, South
Fargo, ND 58104
(877) Pure-DNA FAX: (701) 280-1642
(701) 297-9256
http://www.aldevron.com

Aldrich Chemical
P.O. Box 2060
Milwaukee, WI 53201
(800) 558-9160 FAX: (800) 962-9591
(414) 273-3850 FAX: (414) 273-4979
http://www.aldrich.sial.com

Alexis Biochemicals
6181 Cornerstone Court East, Suite 103
San Diego, CA 92121
(800) 900-0065 FAX: (858) 658-9224
(858) 658-0065
http://www.alexis-corp.com

Alfa Aesar
30 Bond Street
Ward Hill, MA 10835
(800) 343-0660 FAX: (800) 322-4757
(978) 521-6300 FAX: (978) 521-6350
http://www.alfa.com

Alfa Laval
Avenue de Ble 5 - Bazellaan 5
BE-1140 Brussels, Belgium
32(2) 728 3811
FAX: 32(2) 728 3917 or 32(2) 728 3985
http://www.alfalaval.com

Alice King Chatham Medical Arts
11915-17 Inglewood Avenue
Hawthorne, CA 90250
(310) 970-1834 FAX: (310) 970-0121
(310) 970-1063

Allegiance Healthcare
800-964-5227
http://www.allegiance.net

Allelix Biopharmaceuticals
6850 Gorway Drive
Mississauga, Ontario
L4V 1V7 Canada
(905) 677-0831 FAX: (905) 677-9595
http://www.allelix.com

Allentown Caging Equipment
Route 526, P.O. Box 698
Allentown, NJ 08501
(800) 762-CAGE FAX: (609) 259-0449
(609) 259-7951
http://www.acecaging.com

Alltech Associates
Applied Science Labs
2051 Waukegan Road
P.O. Box 23
Deerfield, IL 60015
(800) 255-8324 FAX: (847) 948-1078
(847) 948-8600
http://www.alltechweb.com

Alomone Labs
HaMarpeh 5
P.O. Box 4287
Jerusalem 91042, Israel
972-2-587-2202 FAX: 972-2-587-1101
US: (800) 791-3904
FAX: (800) 791-3912
http://www.alomone.com

Alpha Innotech
14743 Catalina Street
San Leandro, CA 94577
(800) 795-5556 FAX: (510) 483-3227
(510) 483-9620
http://www.alphainnotech.com

Altec Plastics
116 B Street
Boston, MA 02127
(800) 477-8196 FAX: (617) 269-8484
(617) 269-1400

Alza
1900 Charleston Road
P.O. Box 7210
Mountain View, CA 94043
(800) 692-2990 FAX: (650) 564-7070
(650) 564-5000
http://www.alza.com

Alzet
c/o Durect Corporation
P.O. Box 530
10240 Bubb Road
Cupertino, CA 95015
(800) 692-2990 (408) 367-4036
FAX: (408) 865-1406
http://www.alzet.com

Amac
160B Larrabee Road
Westbrook, ME 04092
(800) 458-5060 FAX: (207) 854-0116
(207) 854-0426

Amaresco
30175 Solon Industrial Parkway
Solon, Ohio 44139
(800) 366-1313 FAX: (440) 349-1182
(440) 349-1313

Ambion
2130 Woodward Street, Suite 200
Austin, TX 78744
(800) 888-8804 FAX: (512) 651-0190
(512) 651-0200
http://www.ambion.com

American Association of Blood Banks
College of American Pathologists
325 Waukegan Road
Northfield, IL 60093
(800) 323-4040 FAX: (847) 8166
(847) 832-7000
http://www.cap.org

American Bio-Technologies
See Intracel Corporation

American Bioanalytical
15 Erie Drive
Natick, MA 01760
(800) 443-0600 FAX: (508) 655-2754
(508) 655-4336
http://www.americanbio.com

American Cyanamid
P.O. Box 400
Princeton, NJ 08543
(609) 799-0400 FAX: (609) 275-3502
http://www.cyanamid.com

American HistoLabs
7605-F Airpark Road
Gaithersburg, MD 20879
(301) 330-1200 FAX: (301) 330-6059

American International Chemical
17 Strathmore Road
Natick, MA 01760
(800) 238-0001 (508) 655-5805
http://www.aicma.com

American Laboratory Supply
See American Bioanalytical

American Medical Systems
10700 Bren Road West
Minnetonka, MN 55343
(800) 328-3881 FAX: (612) 930-6654
(612) 933-4666
http://www.visitams.com

American Qualex
920-A Calle Negocio
San Clemente, CA 92673
(949) 492-8298 FAX: (949) 492-6790
http://www.americanqualex.com

American Radiolabeled Chemicals
11624 Bowling Green
St. Louis, MO 63146
(800) 331-6661 FAX: (800) 999-9925
(314) 991-4545 FAX: (314) 991-4692
http://www.arc-inc.com

American Scientific Products
See VWR Scientific Products

American Society for
Histocompatibility and
Immunogenetics
P.O. Box 15804
Lenexa, KS 66285
(913) 541-0009 FAX: (913) 541-0156
http://www.swmed.edu/home_pages/ASHI/ashi.htm

American Type Culture Collection (ATCC)
10801 University Boulevard
Manassas, VA 20110
(800) 638-6597 FAX: (703) 365-2750
(703) 365-2700
http://www.atcc.org

Amersham
See Amersham Pharmacia Biotech

Amersham International
Amersham Place
Little Chalfont, Buckinghamshire
HP7 9NA, UK
(44) 1494-544100
FAX: (44) 1494-544350
http://www.apbiotech.com

Amersham Medi-Physics
Also see Nycomed Amersham
3350 North Ridge Avenue
Arlington Heights, IL 60004
(800) 292-8514 FAX: (800) 807-2382
http://www.nycomed-amersham.com

Amersham Pharmacia Biotech
800 Centennial Avenue
P.O. Box 1327
Piscataway, NJ 08855
(800) 526-3593 FAX: (877) 295-8102
(732) 457-8000
http://www.apbiotech.com

Amgen
1 Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320
(800) 926-4369 FAX: (805) 498-9377
(805) 447-5725
http://www.amgen.com

Amicon
Scientific Systems Division
72 Cherry Hill Drive
Beverly, MA 01915
(800) 426-4266 FAX: (978) 777-6204
(978) 777-3622
http://www.amicon.com

Amika
8980F Route 108
Oakland Center
Columbia, MD 21045
(800) 547-6766 FAX: (410) 997-7104
(410) 997-0100
http://www.amika.com

Amoco Performance Products
See BPAmoco

AMPI
See Pacer Scientific

Amrad
576 Swan Street
Richmond, Victoria 3121, Australia
613-9208-4000
FAX: 613-9208-4350
http://www.amrad.com.au

Amresco
30175 Solon Industrial Parkway
Solon, OH 44139
(800) 829-2805 FAX: (440) 349-1182
(440) 349-1199

Anachemia Chemicals
3 Lincoln Boulevard
Rouses Point, NY 12979
(800) 323-1414 FAX: (518) 462-1952
(518) 462-1066
http://www.anachemia.com

Ana-Gen Technologies
4015 Fabian Way
Palo Alto, CA 94303
(800) 654-4671 FAX: (650) 494-3893
(650) 494-3894
http://www.ana-gen.com

Analox Instruments USA
P.O. Box 208
Lunenburg, MA 01462
(978) 582-9368 FAX: (978) 582-9588
http://www.analox.com

Analytical Biological Services
Cornell Business Park 701-4
Wilmington, DE 19801
(800) 391-2391 FAX: (302) 654-8046
(302) 654-4492
http://www.ABSbioreagents.com

Analytical Genetics Testing Center
7808 Cherry Creek S. Drive, Suite 201
Denver, CO 80231
(800) 204-4721 FAX: (303) 750-2171
(303) 750-2023
http://www.geneticid.com

AnaSpec
2149 O'Toole Avenue, Suite F
San Jose, CA 95131
(800) 452-5530 FAX: (408) 452-5059
(408) 452-5055
http://www.anaspec.com

Ancare
2647 Grand Avenue
P.O. Box 814
Bellmore, NY 11710
(800) 645-6379 FAX: (516) 781-4937
(516) 781-0755
http://www.ancare.com

Ancell
243 Third Street North
P.O. Box 87
Bayport, MN 55033
(800) 374-9523 FAX: (651) 439-1940
(651) 439-0835
http://www.ancell.com

Anderson Instruments
500 Technology Court
Smyrna, GA 30082
(800) 241-6898 FAX: (770) 319-5306
(770) 319-9999
http://www.graseby.com

Andreas Hettich
Gartenstrasse 100
Postfach 260
D-78732 Tuttlingen, Germany
(49) 7461 705 0
FAX: (49) 7461 705-122
http://www.hettich-centrifugen.de

Anesthetic Vaporizer Services
10185 Main Street
Clarence, NY 14031
(719) 759-8490
http://www.avapor.com

Animal Identification and Marking Systems (AIMS)
13 Winchester Avenue
Budd Lake, NJ 07828
(908) 684-9105 FAX: (908) 684-9106
http://www.animalid.com

Annovis
34 Mount Pleasant Drive
Aston, PA 19014
(800) EASY-DNA FAX: (610) 361-8255
(610) 361-9224
http://www.annovis.com

Apotex
150 Signet Drive
Weston, Ontario
M9L 1T9 Canada
(416) 749-9300 FAX: (416) 749-2646
http://www.apotex.com

Apple Scientific
11711 Chillicothe Road, Unit 2
P.O. Box 778
Chesterland, OH 44026
(440) 729-3056 FAX: (440) 729-0928
http://www.applesci.com

Applied Biosystems
See PE Biosystems

Applied Imaging
2380 Walsh Avenue, Bldg. B
Santa Clara, CA 95051
(800) 634-3622 FAX: (408) 562-0264
(408) 562-0250
http://www.aicorp.com

Applied Photophysics
203-205 Kingston Road
Leatherhead, Surrey, KT22 7PB
UK
(44) 1372-386537

Applied Precision
1040 12th Avenue Northwest
Issaquah, Washington 98027
(425) 557-1000
FAX: (425) 557-1055
http://www.api.com/index.html

Appligene Oncor
Parc d'Innovation
Rue Geiler de Kaysersberg, BP 72
67402 Illkirch Cedex, France
(33) 88 67 22 67
FAX: (33) 88 67 19 45
http://www.oncor.com/prod-app.htm

Applikon
1165 Chess Drive, Suite G
Foster City, CA 94404
(650) 578-1396 FAX: (650) 578-8836
http://www.applikon.com

Appropriate Technical Resources
9157 Whiskey Bottom Road
Laurel, MD 20723
(800) 827-5931 FAX: (410) 792-2837
http://www.atrbiotech.com

APV Gaulin
100 S. CP Avenue
Lake Mills, WI 53551
(888) 278-4321 FAX: (888) 278-5329
http://www.apv.com

Aqualon
See Hercules Aqualon

Aquarium Systems
8141 Tyler Boulevard
Mentor, OH 44060
(800) 822-1100 FAX: (440) 255-8994
(440) 255-1997
http://www.aquariumsystems.com

Aquebogue Machine and Repair Shop
Box 2055
Main Road
Aquebogue, NY 11931
(631) 722-3635 FAX: (631) 722-3106

Archer Daniels Midland
4666 Faries Parkway
Decatur, IL 62525
(217) 424-5200
http://www.admworld.com

Archimica Florida
P.O. Box 1466
Gainesville, FL 32602
(800) 331-6313 FAX: (352) 371-6246
(352) 376-8246
http://www.archimica.com

Arcor Electronics
1845 Oak Street #15
Northfield, IL 60093
(847) 501-4848

Arcturus Engineering
400 Logue Avenue
Mountain View, CA 94043
(888) 446 7911 FAX: (650) 962 3039
(650) 962 3020
http://www.arctur.com

Ardais Corporation
One Ledgemont Center
128 Spring Street
Lexington, MA 02421
(781) 274-6420 (781) 274-6421
http://www.ardais.com

Argonaut Technologies
887 Industrial Road, Suite G
San Carlos, CA 94070
(650) 998-1350 FAX: (650) 598-1359
http://www.argotech.com

Ariad Pharmaceuticals
26 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139
(617) 494-0400 FAX: (617) 494-8144
http://www.ariad.com

Armour Pharmaceuticals
See Rhone-Poulenc Rorer

Aronex Pharmaceuticals
8707 Technology Forest Place
The Woodlands, TX 77381
(281) 367-1666 FAX: (281) 367-1676
http://www.aronex.com

Artisan Industries
73 Pond Street
Waltham, MA 02254
(617) 893-6800
http://www.artisanind.com

ASI Instruments
12900 Ten Mile Road
Warren, MI 48089
(800) 531-1105 FAX: (810) 756-9737
(810) 756-1222
http://www.asi-instruments.com

Aspen Research Laboratories
1700 Buerkle Road
White Bear Lake, MN 55140
(651) 264-6000 FAX: (651) 264-6270
http://www.aspenresearch.com

Associates of Cape Cod
704 Main Street
Falmouth, MA 02540
(800) LAL-TEST FAX: (508) 540-8680
(508) 540-3444
http://www.acciusa.com

Astra Pharmaceuticals
See AstraZeneca

AstraZeneca
1800 Concord Pike
Wilmington, DE 19850
(302) 886-3000 FAX: (302) 886-2972
http://www.astrazeneca.com

AT Biochem
30 Spring Mill Drive
Malvern, PA 19355
(610) 889-9300 FAX: (610) 889-9304

ATC Diagnostics
See Vysis

ATCC
See American Type Culture Collection

Athens Research and Technology
P.O. Box 5494
Athens, GA 30604
(706) 546-0207 FAX: (706) 546-7395

Atlanta Biologicals
1425-400 Oakbrook Drive
Norcross, GA 30093
(800) 780-7788 or (770) 446-1404
FAX: (800) 780-7374 or (770) 446-1404
http://www.atlantabio.com

Atomergic Chemical
71 Carolyn Boulevard
Farmingdale, NY 11735
(631) 694-9000 FAX: (631) 694-9177
http://www.atomergic.com

Atomic Energy of Canada
2251 Speakman Drive
Mississauga, Ontario
L5K 1B2 Canada
(905) 823-9040 FAX: (905) 823-1290
http://www.aecl.ca

ATR
P.O. Box 460
Laurel, MD 20725
(800) 827-5931 FAX: (410) 792-2837
(301) 470-2799
http://www.atrbiotech.com

Aurora Biosciences
11010 Torreyana Road
San Diego, CA 92121
(858) 404-6600 FAX: (858) 404-6714
http://www.aurorabio.com

Automatic Switch Company
A Division of Emerson Electric
50 Hanover Road
Florham Park, NJ 07932
(800) 937-2726 FAX: (973) 966-2628
(973) 966-2000
http://www.asco.com

Avanti Polar Lipids
700 Industrial Park Drive
Alabaster, AL 35007
(800) 227-0651 FAX: (800) 229-1004
(205) 663-2494 FAX: (205) 663-0756
http://www.avantilipids.com

Aventis
BP 67917
67917 Strasbourg Cedex 9, France
33 (0) 388 99 11 00
FAX: 33 (0) 388 99 11 01
http://www.aventis.com

Aventis Pasteur
1 Discovery Drive
Swiftwater, PA 18370
(800) 822-2463 FAX: (570) 839-0955
(570) 839-7187
http://www.aventispasteur.com/usa

Avery Dennison
150 North Orange Grove Boulevard
Pasadena, CA 91103
(800) 462-8379 FAX: (626) 792-7312
(626) 304-2000
http://www.averydennison.com

Avestin
2450 Don Reid Drive
Ottawa, Ontario
K1H 1E1 Canada
(888) AVESTIN FAX: (613) 736-8086
(613) 736-0019
http://www.avestin.com

AVIV Instruments
750 Vassar Avenue
Lakewood, NJ 08701
(732) 367-1663 FAX: (732) 370-0032
http://www.avivinst.com

Axon Instruments
1101 Chess Drive
Foster City, CA 94404
(650) 571-9400 FAX: (650) 571-9500
http://www.axon.com

Azon
720 Azon Road
Johnson City, NY 13790
(800) 847-9374 FAX: (800) 635-6042
(607) 797-2368
http://www.azon.com

BAbCO
1223 South 47th Street
Richmond, CA 94804
(800) 92-BABCO FAX: (510) 412-8940
(510) 412-8930
http://www.babco.com

Bacharach
625 Alpha Drive
Pittsburgh, PA 15238
(800) 736-4666 FAX: (412) 963-2091
(412) 963-2000
http://www.bacharach-inc.com

Bachem Bioscience
3700 Horizon Drive
King of Prussia, PA 19406
(800) 634-3183 FAX: (610) 239-0800
(610) 239-0300
http://www.bachem.com

Bachem California
3132 Kashiwa Street
P.O. Box 3426
Torrance, CA 90510
(800) 422-2436 FAX: (310) 530-1571
(310) 539-4171
http://www.bachem.com

Baekon
18866 Allendale Avenue
Saratoga, CA 95070
(408) 972-8779 FAX: (408) 741-0944

Baker Chemical
See J.T. Baker

Bangs Laboratories
9025 Technology Drive
Fishers, IN 46038
(317) 570-7020 FAX: (317) 570-7034
http://www.bangslabs.com

Bard Parker
See Becton Dickinson

Barnstead/Thermolyne
P.O. Box 797
2555 Kerper Boulevard
Dubuque, IA 52004
(800) 446-6060 FAX: (319) 589-0516
http://www.barnstead.com

Barrskogen
4612 Laverock Place N
Washington, DC 20007
(800) 237-9192 FAX: (301) 464-7347

BAS
See Bioanalytical Systems

BASF
Specialty Products
3000 Continental Drive North
Mt. Olive, NJ 07828
(800) 669-2273 FAX: (973) 426-2610
http://www.basf.com

Baum, W.A.
620 Oak Street
Copiague, NY 11726
(631) 226-3940 FAX: (631) 226-3969
http://www.wabaum.com

Bausch & Lomb
One Bausch & Lomb Place
Rochester, NY 14604
(800) 344-8815 FAX: (716) 338-6007
(716) 338-6000
http://www.bausch.com

Baxter
Fenwal Division
1627 Lake Cook Road
Deerfield, IL 60015
(800) 766-1077 FAX: (800) 395-3291
(847) 940-6599 FAX: (847) 940-5766
http://www.powerfulmedicine.com

Baxter Healthcare
One Baxter Parkway
Deerfield, IL 60015
(800) 777-2298 FAX: (847) 948-3948
(847) 948-2000
http://www.baxter.com

Baxter Scientific Products
See VWR Scientific

Bayer
Agricultural Division
Animal Health Products
12707 Shawnee Mission Pkwy.
Shawnee Mission, KS 66201
(800) 255-6517 FAX: (913) 268-2803
(913) 268-2000
http://www.bayerus.com

Bayer
Diagnostics Division (Order Services)
P.O. Box 2009
Mishiwaka, IN 46546
(800) 248-2637 FAX: (800) 863-6882
(219) 256-3390
http://www.bayer.com

Bayer Diagnostics
511 Benedict Avenue
Tarrytown, NY 10591
(800) 255-3232 FAX: (914) 524-2132
(914) 631-8000
http://www.bayerdiag.com

Bayer Plc
Diagnostics Division
Bayer House, Strawberry Hill
Newbury, Berkshire RG14 1JA, UK
(44) 1635-563000
FAX: (44) 1635-563393
http://www.bayer.co.uk

BD Immunocytometry Systems
2350 Qume Drive
San Jose, CA 95131
(800) 223-8226 FAX: (408) 954-BDIS
http://www.bdfacs.com

BD Labware
Two Oak Park
Bedford, MA 01730
(800) 343-2035 FAX: (800) 743-6200
http://www.bd.com/labware

BD PharMingen
10975 Torreyana Road
San Diego, CA 92121
(800) 848-6227 FAX: (858) 812-8888
(858) 812-8800
http://www.pharmingen.com

BD Transduction Laboratories
133 Venture Court
Lexington, KY 40511
(800) 227-4063 FAX: (606) 259-1413
(606) 259-1550
http://www.translab.com

BDH Chemicals
Broom Road
Poole, Dorset BH12 4NN, UK
(44) 1202-745520
FAX: (44) 1202- 2413720

BDH Chemicals
See Hoefer Scientific Instruments

BDIS
See BD Immunocytometry Systems

Beckman Coulter
4300 North Harbor Boulevard
Fullerton, CA 92834
(800) 233-4685 FAX: (800) 643-4366
(714) 871-4848
http://www.beckman-coulter.com

Beckman Instruments
Spinco Division/Bioproducts Operation
1050 Page Mill Road
Palo Alto, CA 94304
(800) 742-2345 FAX: (415) 859-1550
(415) 857-1150
http://www.beckman-coulter.com

Becton Dickinson Immunocytometry & Cellular Imaging
2350 Qume Drive
San Jose, CA 95131
(800) 223-8226 FAX: (408) 954-2007
(408) 432-9475
http://www.bdfacs.com

Becton Dickinson Labware
1 Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417
(888) 237-2762 FAX: (800) 847-2220
(201) 847-4222
http://www.bdfacs.com

Becton Dickinson Labware
2 Bridgewater Lane
Lincoln Park, NJ 07035
(800) 235-5953 FAX: (800) 847-2220
(201) 847-4222
http://www.bdfacs.com

Becton Dickinson Primary
Care Diagnostics
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152
(800) 675-0908　FAX: (410) 316-4723
(410) 316-4000
http://www.bdfacs.com

Behringwerke Diagnostika
Hoechster Strasse 70
P-65835 Liederback, Germany
(49) 69-30511　FAX: (49) 69-303-834

Bellco Glass
340 Edrudo Road
Vineland, NJ 08360
(800) 257-7043　FAX: (856) 691-3247
(856) 691-1075
http://www.bellcoglass.com

Bender Biosystems
See Serva

Beral Enterprises
See Garren Scientific

Berkeley Antibody
See BAbCO

Bernsco Surgical Supply
25 Plant Avenue
Hauppague, NY 11788
(800) TIEMANN　FAX: (516) 273-6199
(516) 273-0005
http://www.bernsco.com

Beta Medical and Scientific
(Datesand Ltd.)
2 Ferndale Road
Sale, Manchester M33 3GP, UK
(44) 1612 317676
FAX: (44) 1612 313656

Bethesda Research Laboratories (BRL)
See Life Technologies

Biacore
200 Centennial Avenue, Suite 100
Piscataway, NJ 08854
(800) 242-2599　FAX: (732) 885-5669
(732) 885-5618
http://www.biacore.com

Bilaney Consultants
St. Julian's
Sevenoaks, Kent TN15 0RX, UK
(44) 1732 450002
FAX: (44) 1732 450003
http://www.bilaney.com

Binding Site
5889 Oberlin Drive, Suite 101
San Diego, CA 92121
(800) 633-4484　FAX: (619) 453-9189
(619) 453-9177
http://www.bindingsite.co.uk

BIO 101
See Qbiogene

Bio Image
See Genomic Solutions

Bioanalytical Systems
2701 Kent Avenue
West Lafayette, IN 47906
(800) 845-4246　FAX: (765) 497-1102
(765) 463-4527
http://www.bioanalytical.com

Biocell
2001 University Drive
Rancho Dominguez, CA 90220
(800) 222-8382　FAX: (310) 637-3927
(310) 537-3300
http://www.biocell.com

Biocoat
See BD Labware

BioComp Instruments
650 Churchill Road
Fredericton, New Brunswick
E3B 1P6 Canada
(800) 561-4221　FAX: (506) 453-3583
(506) 453-4812
http://131.202.97.21

BioDesign
P.O. Box 1050
Carmel, NY 10512
(914) 454-6610　FAX: (914) 454-6077
http://www.biodesignofny.com

BioDiscovery
4640 Admiralty Way, Suite 710
Marina Del Rey, CA 90292
(310) 306-9310　FAX: (310) 306-9109
http://www.biodiscovery.com

Bioengineering AG
Sagenrainstrasse 7
CH8636 Wald, Switzerland
(41) 55-256-8-111
FAX: (41) 55-256-8-256

Biofluids
Division of Biosource International
1114 Taft Street
Rockville, MD 20850
(800) 972-5200　FAX: (301) 424-3619
(301) 424-4140
http://www.biosource.com

BioFX Laboratories
9633 Liberty Road, Suite S
Randallstown, MD 21133
(800) 445-6447　FAX: (410) 498-6008
(410) 496-6006
http://www.biofx.com

BioGenex Laboratories
4600 Norris Canyon Road
San Ramon, CA 94583
(800) 421-4149　FAX: (925) 275-0580
(925) 275-0550
http://www.biogenex.com

Bioline
2470 Wrondel Way
Reno, NV 89502
(888) 257-5155　FAX: (775) 828-7676
(775) 828-0202
http://www.bioline.com

Bio-Logic Research & Development
1, rue de l-Europe
A.Z. de Font-Ratel
38640 CLAIX, France
(33) 76-98-68-31
FAX: (33) 76-98-69-09

Biological Detection Systems
See Cellomics or Amersham

Biomeda
1166 Triton Drive, Suite E
P.O. Box 8045
Foster City, CA 94404
(800) 341-8787　FAX: (650) 341-2299
(650) 341-8787
http://www.biomeda.com

BioMedic Data Systems
1 Silas Road
Seaford, DE 19973
(800) 526-2637　FAX: (302) 628-4110
(302) 628-4100
http://www.bmds.com

Biomedical Engineering
P.O. Box 980694
Virginia Commonwealth University
Richmond, VA 23298
(804) 828-9829　FAX: (804) 828-1008

Biomedical Research Instruments
12264 Wilkins Avenue
Rockville, MD 20852
(800) 327-9498
(301) 881-7911
http://www.biomedinstr.com

Bio/medical Specialties
P.O. Box 1687
Santa Monica, CA 90406
(800) 269-1158　FAX: (800) 269-1158
(323) 938-7515

BioMerieux
100 Rodolphe Street
Durham, North Carolina 27712
(919) 620-2000
http://www.biomerieux.com

BioMetallics
P.O. Box 2251
Princeton, NJ 08543
(800) 999-1961　FAX: (609) 275-9485
(609) 275-0133
http://www.microplate.com

Biomol Research Laboratories
5100 Campus Drive
Plymouth Meeting, PA 19462
(800) 942-0430 FAX: (610) 941-9252
(610) 941-0430
http://www.biomol.com

Bionique Testing Labs
Fay Brook Drive
RR 1, Box 196
Saranac Lake, NY 12983
(518) 891-2356 FAX: (518) 891-5753
http://www.bionique.com

Biopac Systems
42 Aero Camino
Santa Barbara, CA 93117
(805) 685-0066 FAX: (805) 685-0067
http://www.biopac.com

Bioproducts for Science
See Harlan Bioproducts for Science

Bioptechs
3560 Beck Road
Butler, PA 16002
(877) 548-3235 FAX: (724) 282-0745
(724) 282-7145
http://www.bioptechs.com

BIOQUANT-R&M Biometrics
5611 Ohio Avenue
Nashville, TN 37209
(800) 221-0549 (615) 350-7866
FAX: (615) 350-7282
http://www.bioquant.com

Bio-Rad Laboratories
2000 Alfred Nobel Drive
Hercules, CA 94547
(800) 424-6723 FAX: (800) 879-2289
(510) 741-1000 FAX: (510) 741-5800
http://www.bio-rad.com

Bio-Rad Laboratories
Maylands Avenue
Hemel Hempstead, Herts HP2 7TD, UK
http://www.bio-rad.com

Bioreclamation
492 Richmond Road
East Meadow, NY 11554
(516) 483-1196 FAX: (516) 483-4683
http://www.bioreclamation.com

BioRobotics
3-4 Bennell Court
Comberton, Cambridge CB3 7DS, UK
(44) 1223-264345
FAX: (44) 1223-263933
http://www.biorobotics.co.uk

BIOS Laboratories
See Genaissance Pharmaceuticals

Biosearch Technologies
81 Digital Drive
Novato, CA 94949
(800) GENOME1 FAX: (415) 883-8488
(415) 883-8400
http://www.biosearchtech.com

BioSepra
111 Locke Drive
Marlborough, MA 01752
(800) 752-5277 FAX: (508) 357-7595
(508) 357-7500
http://www.biosepra.com

Bio-Serv
18th Street, Suite 1
Frenchtown, NJ 08825
(908) 996-2155 FAX: (908) 996-4123
http://www.bio-serv.com

BioSignal
1744 William Street, Suite 600
Montreal, Quebec
H3J 1R4 Canada
(800) 293-4501 FAX: (514) 937-0777
(514) 937-1010
http://www.biosignal.com

Biosoft
P.O. Box 10938
Ferguson, MO 63135
(314) 524-8029 FAX: (314) 524-8129
http://www.biosoft.com

Biosource International
820 Flynn Road
Camarillo, CA 93012
(800) 242-0607 FAX: (805) 987-3385
(805) 987-0086
http://www.biosource.com

BioSpec Products
P.O. Box 788
Bartlesville, OK 74005
(800) 617-3363 FAX: (918) 336-3363
(918) 336-3363
http://www.biospec.com

Biosure
See Riese Enterprises

Biosym Technologies
See Molecular Simulations

Biosys
21 quai du Clos des Roses
602000 Compiegne, France
(33) 03 4486 2275
FAX: (33) 03 4484 2297

Bio-Tech Research Laboratories
NIAID Repository
Rockville, MD 20850
http://www.niaid.nih.gov/ncn/repos.htm

Biotech Instruments
Biotech House
75A High Street
Kimpton, Hertfordshire SG4 8PU, UK
(44) 1438 832555
FAX: (44) 1438 833040
http://www.biotinst.demon.co.uk

Biotech International
11 Durbell Street
Acacia Ridge, Queensland 4110
Australia
61-7-3370-6396
FAX: 61-7-3370-6370
http://www.avianbiotech.com

Biotech Source
Inland Farm Drive
South Windham, ME 04062
(207) 892-3266 FAX: (207) 892-6774

Bio-Tek Instruments
Highland Industrial Park
P.O. Box 998
Winooski, VT 05404
(800) 451-5172 FAX: (802) 655-7941
(802) 655-4040
http://www.biotek.com

Biotecx Laboratories
6023 South Loop East
Houston, TX 77033
(800) 535-6286 FAX: (713) 643-3143
(713) 643-0606
http://www.biotecx.com

BioTherm
3260 Wilson Boulevard
Arlington, VA 22201
(703) 522-1705 FAX: (703) 522-2606

Bioventures
P.O. Box 2561
848 Scott Street
Murfreesboro, TN 37133
(800) 235-8938 FAX: (615) 896-4837
http://www.bioventures.com

BioWhittaker
8830 Biggs Ford Road
P.O. Box 127
Walkersville, MD 21793
(800) 638-8174 FAX: (301) 845-8338
(301) 898-7025
http://www.biowhittaker.com

Biozyme Laboratories
9939 Hibert Street, Suite 101
San Diego, CA 92131
(800) 423-8199 FAX: (858) 549-0138
(858) 549-4484
http://www.biozyme.com

Bird Products
1100 Bird Center Drive
Palm Springs, CA 92262
(800) 328-4139 FAX: (760) 778-7274
(760) 778-7200
http://www.birdprod.com/bird

B & K Universal
2403 Yale Way
Fremont, CA 94538
(800) USA-MICE FAX: (510) 490-3036

BLS Ltd.
Zselyi Aladar u. 31
1165 Budapest, Hungary
(36) 1-407-2602 FAX: (36) 1-407-2896
http://www.bls-ltd.com

Blue Sky Research
3047 Orchard Parkway
San Jose, CA 95134
(408) 474-0988 FAX: (408) 474-0989
http://www.blueskyresearch.com

Blumenthal Industries
7 West 36th Street, 13th floor
New York, NY 10018
(212) 719-1251 FAX: (212) 594-8828

BOC Edwards
One Edwards Park
301 Ballardvale Street
Wilmington, MA 01887
(800) 848-9800 FAX: (978) 658-7969
(978) 658-5410
http://www.bocedwards.com

Boehringer Ingelheim
900 Ridgebury Road
P.O. Box 368
Ridgefield, CT 06877
(800) 243-0127 FAX: (203) 798-6234
(203) 798-9988
http://www.boehringer-ingelheim.com

Boehringer Mannheim
Biochemicals Division
See Roche Diagnostics

Boekel Scientific
855 Pennsylvania Boulevard
Feasterville, PA 19053
(800) 336-6929 FAX: (215) 396-8264
(215) 396-8200
http://www.boekelsci.com

Bohdan Automation
1500 McCormack Boulevard
Mundelein, IL 60060
(708) 680-3939 FAX: (708) 680-1199

BPAmoco
4500 McGinnis Ferry Road
Alpharetta, GA 30005
(800) 328-4537 FAX: (770) 772-8213
(770) 772-8200
http://www.bpamoco.com

Brain Research Laboratories
Waban P.O. Box 88
Newton, MA 02468
(888) BRL-5544 FAX: (617) 965-6220
(617) 965-5544
http://www.brainresearchlab.com

Braintree Scientific
P.O. Box 850929
Braintree, MA 02185
(781) 843-1644 FAX: (781) 982-3160
http://www.braintreesci.com

Brandel
8561 Atlas Drive
Gaithersburg, MD 20877
(800) 948-6506 FAX: (301) 869-5570
(301) 948-6506
http://www.brandel.com

Branson Ultrasonics
41 Eagle Road
Danbury, CT 06813
(203) 796-0400 FAX: (203) 796-9838
http://www.plasticsnet.com/branson

B. Braun Biotech
999 Postal Road
Allentown, PA 18103
(800) 258-9000 FAX: (610) 266-9319
(610) 266-6262
http://www.bbraunbiotech.com

B. Braun Biotech International
Schwarzenberg Weg 73-79
P.O. Box 1120
D-34209 Melsungen, Germany
(49) 5661-71-3400
FAX: (49) 5661-71-3702
http://www.bbraunbiotech.com

B. Braun-McGaw
2525 McGaw Avenue
Irvine, CA 92614
(800) BBRAUN-2 (800) 624-2963
http://www.bbraunusa.com

B. Braun Medical
Thorncliffe Park
Sheffield S35 2PW, UK
(44) 114-225-9000
FAX: (44) 114-225-9111
http://www.bbmuk.demon.co.uk

Brenntag
P.O. Box 13788
Reading, PA 19612-3788
(610) 926-4151 FAX: (610) 926-4160
http://www.brenntagnortheast.com

Bresatec
See GeneWorks

Bright/Hacker Instruments
17 Sherwood Lane
Fairfield, NJ 07004
(973) 226-8450 FAX: (973) 808-8281
http://www.hackerinstruments.com

Brinkmann Instruments
Subsidiary of Sybron
1 Cantiague Road
P.O. Box 1019
Westbury, NY 11590
(800) 645-3050 FAX: (516) 334-7521
(516) 334-7500
http://www.brinkmann.com

Bristol-Meyers Squibb
P.O. Box 4500
Princeton, NJ 08543
(800) 631-5244 FAX: (800) 523-2965
http://www.bms.com

Broadley James
19 Thomas
Irvine, CA 92618
(800) 288-2833 FAX: (949) 829-5560
(949) 829-5555
http://www.broadleyjames.com

Brookhaven Instruments
750 Blue Point Road
Holtsville, NY 11742
(631) 758-3200 FAX: (631) 758-3255
http://www.bic.com

Brownlee Labs
See Applied Biosystems
Distributed by Pacer Scientific

Bruel & Kjaer
Division of Spectris Technologies
2815 Colonnades Court
Norcross, GA 30071
(800) 332-2040 FAX: (770) 847-8440
(770) 209-6907
http://www.bkhome.com

Bruker Analytical X-Ray Systems
5465 East Cheryl Parkway
Madison, WI 53711
(800) 234-XRAY FAX: (608) 276-3006
(608) 276-3000
http://www.bruker-axs.com

Bruker Instruments
19 Fortune Drive
Billerica, MA 01821
(978) 667-9580 FAX: (978) 667-0985
http://www.bruker.com

BTX
Division of Genetronics
11199 Sorrento Valley Road
San Diego, CA 92121
(800) 289-2465 FAX: (858) 597-9594
(858) 597-6006
http://www.genetronics.com/btx

Buchler Instruments
See Baxter Scientific Products

Buckshire
2025 Ridge Road
Perkasie, PA 18944
(215) 257-0116

Burdick and Jackson
Division of Baxter Scientific Products
1953 S. Harvey Street
Muskegon, MI 49442
(800) 368-0050 FAX: (231) 728-8226
(231) 726-3171
http://www.bandj.com/mainframe.htm

Burleigh Instruments
P.O. Box E
Fishers, NY 14453
(716) 924-9355 FAX: (716) 924-9072
http://www.burleigh.com

Burns Veterinary Supply
1900 Diplomat Drive
Farmer's Branch, TX 75234
(800) 92-BURNS FAX: (972) 243-6841
http://www.burnsvet.com

Burroughs Wellcome
See Glaxo Wellcome

The Butler Company
5600 Blazer Parkway
Dublin, OH 43017
(800) 551-3861 FAX: (614) 761-9096
(614) 761-9095
http://www.wabutler.com

Butterworth Laboratories
54-56 Waldegrave Road
Teddington, Middlesex
TW11 8LG, UK
(44)(0)20-8977-0750
FAX: (44)(0)28-8943-2624
http://www.butterworth-labs.co.uk

Buxco Electronics
95 West Wood Road #2
Sharon, CT 06069
(860) 364-5558 FAX: (860) 364-5116
http://www.buxco.com

C/D/N Isotopes
88 Leacock Street
Pointe-Claire, Quebec
H9R 1H1 Canada
(800) 697-6254 FAX: (514) 697-6148

C.M.A./Microdialysis AB
73 Princeton Street
North Chelmsford, MA 01863
(800) 440-4980 FAX: (978) 251-1950
(978) 251-1940
http://www.microdialysis.com

Calbiochem-Novabiochem
P.O. Box 12087-2087
La Jolla, CA 92039
(800) 854-3417 FAX: (800) 776-0999
(858) 450-9600
http://www.calbiochem.com

California Fine Wire
338 South Fourth Street
Grover Beach, CA 93433
(805) 489-5144 FAX: (805) 489-5352
http://www.calfinewire.com

Calorimetry Sciences
155 West 2050 North
Spanish Fork, UT 84660
(801) 794-2600 FAX: (801) 794-2700
http://www.calscorp.com

Caltag Laboratories
1849 Bayshore Highway, Suite 200
Burlingame, CA 94010
(800) 874-4007 FAX: (650) 652-9030
(650) 652-0468
http://www.caltag.com

Cambrex Corporation
1 Meadowlands Plaza
East Rutherford, NJ 07073
(201) 804-3000 FAX: (201) 804-9852
http://www.cambrex.com

Cambridge Electronic Design
Science Park, Milton Road
Cambridge CB4 0FE, UK
44 (0) 1223-420-186
FAX: 44 (0) 1223-420-488
http://www.ced.co.uk

Cambridge Isotope Laboratories
50 Frontage Road
Andover, MA 01810
(800) 322-1174 FAX: (978) 749-2768
(978) 749-8000
http://www.isotope.com

Cambridge Research Biochemicals
See Zeneca/CRB

Cambridge Technology
109 Smith Place
Cambridge, MA 02138
(6l7) 441-0600 FAX: (617) 497-8800
http://www.camtech.com

Camlab
Nuffield Road
Cambridge CB4 1TH, UK
(44) 122-3424222
FAX: (44) 122-3420856
http://www.camlab.co.uk/home.htm

Campden Instruments
Park Road
Sileby Loughborough
Leicestershire LE12 7TU, UK
(44) 1509-814790
FAX: (44) 1509-816097
http://www.campden-inst.com/home.htm

Cappel Laboratories
See Organon Teknika Cappel

Carl Roth GmgH & Company
Schoemperlenstrasse 1-5
76185 Karlsrube
Germany
(49) 72-156-06164
FAX: (49) 72-156-06264
http://www.carl-roth.de

Carl Zeiss
One Zeiss Drive
Thornwood, NY 10594
(800) 233-2343 FAX: (914) 681-7446
(914) 747-1800
http://www.zeiss.com

Carlo Erba Reagenti
Via Winckelmann 1
20148 Milano
Lombardia, Italy
(39) 0-29-5231
FAX: (39) 0-29-5235-904
http://www.carloerbareagenti.com

Carolina Biological Supply
2700 York Road
Burlington, NC 27215
(800) 334-5551 FAX: (336) 584-76869
(336) 584-0381
http://www.carolina.com

Carolina Fluid Components
9309 Stockport Place
Charlotte, NC 28273
(704) 588-6101 FAX: (704) 588-6115
http://www.cfcsite.com

Cartesian Technologies
17851 Skypark Circle, Suite C
Irvine, CA 92614
(800) 935-8007
http://cartesiantech.com

Cayman Chemical
1180 East Ellsworth Road
Ann Arbor, MI 48108
(800) 364-9897 FAX: (734) 971-3640
(734) 971-3335
http://www.caymanchem.com

CB Sciences
One Washington Street, Suite 404
Dover, NH 03820
(800) 234-1757 FAX: (603) 742-2455
http://www.cbsci.com

CBS Scientific
P.O. Box 856
Del Mar, CA 92014
(800) 243-4959 FAX: (858) 755-0733
(858) 755-4959
http://www.cbssci.com

CCR (Coriell Cell Repository)
See Coriell Institute for
Medical Research

CE Instruments
Grand Avenue Parkway
Austin, TX 78728
(800) 876-6711 FAX: (512) 251-1597
http://www.ceinstruments.com

Cedarlane Laboratories
5516 8th Line, R.R. #2
Hornby, Ontario
L0P 1E0 Canada
(905) 878-8891 FAX: (905) 878-7800
http://www.cedarlanelabs.com

CEL Associates
P.O. Box 721854
Houston, TX 77272
(800) 537-9339 FAX: (281) 933-0922
(281) 933-9339
http://www.cel-1.com

Cel-Line Associates
See Erie Scientific

Celite World Minerals
130 Castilian Drive
Santa Barbara, CA 93117
(805) 562-0200 FAX: (805) 562-0299
http://www.worldminerals.com/celite

Cell Genesys
342 Lakeside Drive
Foster City, CA 94404
(650) 425-4400 FAX: (650) 425-4457
http://www.cellgenesys.com

Cell Signaling Technology
166B Cummings Center
Beverly, MA 01915
(877) 616-CELL FAX: (978) 867-2388
(978) 867-2488
http://www.cellsignal.com

Cell Systems
12815 NE 124th Street, Suite A
Kirkland, WA 98034
(800) 697-1211 FAX: (425) 820-6762
(425) 823-1010

Cellmark Diagnostics
20271 Goldenrod Lane
Germantown, MD 20876
(800) 872-5227 FAX: (301) 428-4877
(301) 428-4980
http://www.cellmark-labs.com

Cellomics
635 William Pitt Way
Pittsburgh, PA 15238
(888) 826-3857 FAX: (412) 826-3850
(412) 826-3600
http://www.cellomics.com

Celltech
216 Bath Road
Slough, Berkshire SL1 4EN, UK
(44) 1753 534655
FAX: (44) 1753 536632
http://www.celltech.co.uk

Cellular Products
872 Main Street
Buffalo, NY 14202
(800) CPI-KITS FAX: (716) 882-0959
(716) 882-0920
http://www.zeptometrix.com

CEM
P.O. Box 200
Matthews, NC 28106
(800) 726-3331

Centers for Disease Control
1600 Clifton Road NE
Atlanta, GA 30333
(800) 311-3435 FAX: (888) 232-3228
(404) 639-3311
http://www.cdc.gov

CERJ
Centre d'Elevage Roger Janvier
53940 Le Genest Saint Isle
France

Cetus
See Chiron

Chance Propper
Warly, West Midlands B66 1NZ, UK
(44)(0)121-553-5551
FAX: (44)(0)121-525-0139

Charles River Laboratories
251 Ballardvale Street
Wilmington, MA 01887
(800) 522-7287 FAX: (978) 658-7132
(978) 658-6000
http://www.criver.com

Charm Sciences
36 Franklin Street
Malden, MA 02148
(800) 343-2170 FAX: (781) 322-3141
(781) 322-1523
http://www.charm.com

Chase-Walton Elastomers
29 Apsley Street
Hudson, MA 01749
(800) 448-6289 FAX: (978) 562-5178
(978) 568-0202
http://www.chase-walton.com

ChemGenes
Ashland Technology Center
200 Homer Avenue
Ashland, MA 01721
(800) 762-9323 FAX: (508) 881-3443
(508) 881-5200
http://www.chemgenes.com

Chemglass
3861 North Mill Road
Vineland, NJ 08360
(800) 843-1794 FAX: (856) 696-9102
(800) 696-0014
http://www.chemglass.com

Chemicon International
28835 Single Oak Drive
Temecula, CA 92590
(800) 437-7500 FAX: (909) 676-9209
(909) 676-8080
http://www.chemicon.com

Chem-Impex International
935 Dillon Drive
Wood Dale, IL 60191
(800) 869-9290 FAX: (630) 766-2218
(630) 766-2112
http://www.chemimpex.com

Chem Service
P.O. Box 599
West Chester, PA 19381-0599
(610) 692-3026 FAX: (610) 692-8729
http://www.chemservice.com

Chemsyn Laboratories
13605 West 96th Terrace
Lenexa, KS 66215
(913) 541-0525 FAX: (913) 888-3582
http://www.tech.epcorp.com/ChemSyn/chemsyn.htm

Chemunex USA
1 Deer Park Drive, Suite H-2
Monmouth Junction, NJ 08852
(800) 411-6734
http://www.chemunex.com

Cherwell Scientific Publishing
The Magdalen Centre
Oxford Science Park
Oxford OX44GA, UK
(44)(1) 865-784-800
FAX: (44)(1) 865-784-801
http://www.cherwell.com

ChiRex Cauldron
383 Phoenixville Pike
Malvern, PA 19355
(610) 727-2215 FAX: (610) 727-5762
http://www.chirex.com

Chiron Diagnostics
See Bayer Diagnostics

Chiron Mimotopes Peptide Systems
See Multiple Peptide Systems

Chiron
4560 Horton Street
Emeryville, CA 94608
(800) 244-7668 FAX: (510) 655-9910
(510) 655-8730
http://www.chiron.com

Chrom Tech
P.O. Box 24248
Apple Valley, MN 55124
(800) 822-5242 FAX: (952) 431-6345
http://www.chromtech.com

Chroma Technology
72 Cotton Mill Hill, Unit A-9
Brattleboro, VT 05301
(800) 824-7662 FAX: (802) 257-9400
(802) 257-1800
http://www.chroma.com

Chromatographie
ZAC de Moulin No. 2
91160 Saulx les Chartreux
France
(33) 01-64-54-8969
FAX: (33) 01-69-0988091
http://www.chromatographie.com

Chromogenix
Taljegardsgatan 3
431-53 Mlndal, Sweden
(46) 31-706-20-70
FAX: (46) 31-706-20-80
http://www.chromogenix.com

Chrompack USA
c/o Varian USA
2700 Mitchell Drive
Walnut Creek, CA 94598
(800) 526-3687 FAX: (925) 945-2102
(925) 939-2400
http://www.chrompack.com

Chugai Biopharmaceuticals
6275 Nancy Ridge Drive
San Diego, CA 92121
(858) 535-5900 FAX: (858) 546-5973
http://www.chugaibio.com

Ciba-Corning Diagnostics
See Bayer Diagnostics

Ciba-Geigy
See Ciba Specialty Chemicals or Novartis Biotechnology

Ciba Specialty Chemicals
540 White Plains Road
Tarrytown, NY 10591
(800) 431-1900 FAX: (914) 785-2183
(914) 785-2000
http://www.cibasc.com

Ciba Vision
Division of Novartis AG
11460 Johns Creek Parkway
Duluth, GA 30097
(770) 476-3937
http://www.cvworld.com

Cidex
Advanced Sterilization Products
33 Technology Drive
Irvine, CA 92618
(800) 595-0200 (949) 581-5799
http://www.cidex.com/ASPnew.htm

Cinna Scientific
Subsidiary of Molecular Research Center
5645 Montgomery Road
Cincinnati, OH 45212
(800) 462-9868 FAX: (513) 841-0080
(513) 841-0900
http://www.mrcgene.com

Cistron Biotechnology
10 Bloomfield Avenue
Pine Brook, NJ 07058
(800) 642-0167 FAX: (973) 575-4854
(973) 575-1700
http://www.cistronbio.com

Clark Electromedical Instruments
See Harvard Apparatus

Clay Adam
See Becton Dickinson Primary Care Diagnostics

CLB (Central Laboratory of the Netherlands)
Blood Transfusion Service
P.O. Box 9190
1006 AD Amsterdam, The Netherlands
(31) 20-512-9222
FAX: (31) 20-512-3332

Cleveland Scientific
P.O. Box 300
Bath, OH 44210
(800) 952-7315 FAX: (330) 666-2240
http://www.clevelandscientific.com

Clonetics
Division of BioWhittaker
http://www.clonetics.com
Also see BioWhittaker

Clontech Laboratories
1020 East Meadow Circle
Palo Alto, CA 94303
(800) 662-2566 FAX: (800) 424-1350
(650) 424-8222 FAX: (650) 424-1088
http://www.clontech.com

Closure Medical Corporation
5250 Greens Dairy Road
Raleigh, NC 27616
(919) 876-7800 FAX: (919) 790-1041
http://www.closuremed.com

CMA Microdialysis AB
73 Princeton Street
North Chelmsford, MA 01863
(800) 440-4980 FAX: (978) 251-1950
(978) 251 1940
http://www.microdialysis.com

Cocalico Biologicals
449 Stevens Road
P.O. Box 265
Reamstown, PA 17567
(717) 336-1990 FAX: (717) 336-1993

Coherent Laser
5100 Patrick Henry Drive
Santa Clara, CA 95056
(800) 227-1955 FAX: (408) 764-4800
(408) 764-4000
http://www.cohr.com

Cohu
P.O. Box 85623
San Diego, CA 92186
(858) 277-6700 FAX: (858) 277-0221
http://www.COHU.com/cctv

Cole-Parmer Instrument
625 East Bunker Court
Vernon Hills, IL 60061
(800) 323-4340 FAX: (847) 247-2929
(847) 549-7600
http://www.coleparmer.com

Collaborative Biomedical Products and Collaborative Research
See Becton Dickinson Labware

Collagen Aesthetics
1850 Embarcadero Road
Palo Alto, CA 94303
(650) 856-0200 FAX: (650) 856-0533
http://www.collagen.com

Collagen Corporation
See Collagen Aesthetics

College of American Pathologists
325 Waukegan Road
Northfield, IL 60093
(800) 323-4040 FAX: (847) 832-8000
(847) 446-8800
http://www.cap.org/index.cfm

Colonial Medical Supply
504 Wells Road
Franconia, NH 03580
(603) 823-9911 FAX: (603) 823-8799
http://www.colmedsupply.com

Colorado Serum
4950 York Street
Denver, CO 80216
(800) 525-2065 FAX: (303) 295-1923
http://www.colorado-serum.com

Columbia Diagnostics
8001 Research Way
Springfield, VA 22153
(800) 336-3081 FAX: (703) 569-2353
(703) 569-7511
http://www.columbiadiagnostics.com

Columbus Instruments
950 North Hague Avenue
Columbus, OH 43204
(800) 669-5011 FAX: (614) 276-0529
(614) 276-0861
http://www.columbusinstruments.com

Compu Cyte Corp.
12 Emily Street
Cambridge, MA 02139
(800) 840-1303 FAX: (617) 577-4501
(617) 492-1300
http://www.compucyte.com

Compugen
25 Leek Crescent
Richmond Hill, Ontario
L4B 4B3 Canada
800-387-5045 FAX: (905) 707-2020
(905) 707-2000
http://www.compugen.com/locations.htm

Computer Associates International
One Computer Associates Plaza
Islandia, NY 11749
(631) 342-6000 FAX: (631) 342-6800
http://www.cai.com

Connaught Laboratories
See Aventis Pasteur

Connectix
2955 Campus Drive, Suite 100
San Mateo, CA 94403
(800) 950-5880 FAX: (650) 571-0850
(650) 571-5100
http://www.connectix.com

Contech
99 Hartford Avenue
Providence, RI 02909
(401) 351-4890 FAX: (401) 421-5072
http://www.iol.ie/~burke/contech.html

Continental Laboratory Products
5648 Copley Drive
San Diego, CA 92111
(800) 456-7741 FAX: (858) 279-5465
(858) 279-5000
http://www.conlab.com

ConvaTec
Professional Services
P.O. Box 5254
Princeton, NJ 08543
(800) 422-8811
http://www.convatec.com

Cooper Instruments & Systems
P.O. Box 3048
Warrenton, VA 20188
(800) 344-3921 FAX: (540) 347-4755
(540) 349-4746
http://www.cooperinstruments.com

Cooperative Human Tissue Network
(866) 462-2486
http://www.chtn.ims.nci.nih.gov

Cora Styles Needles 'N Blocks
56 Milton Street
Arlington, MA 02474
(781) 648-6289 FAX: (781) 641-7917

Coriell Cell Repository (CCR)
See Coriell Institute for
Medical Research

Coriell Institute for Medical Research
Human Genetic Mutant Repository
401 Haddon Avenue
Camden, NJ 08103
(856) 966-7377 FAX: (856) 964-0254
http://arginine.umdnj.edu

Corion
8 East Forge Parkway
Franklin, MA 02038
(508) 528-4411 FAX: (508) 520-7583
(800) 598-6783
http://www.corion.com

Corning and Corning Science Products
P.O. Box 5000
Corning, NY 14831
(800) 222-7740 FAX: (607) 974-0345
(607) 974-9000
http://www.corning.com

Costar
See Corning

Coulbourn Instruments
7462 Penn Drive
Allentown, PA 18106
(800) 424-3771 FAX: (610) 391-1333
(610) 395-3771
http://www.coulbourninst.com

Coulter Cytometry
See Beckman Coulter

Covance Research Products
465 Swampbridge Road
Denver, PA 17517
(800) 345-4114 FAX: (717) 336-5344
(717) 336-4921
http://www.covance.com

Coy Laboratory Products
14500 Coy Drive
Grass Lake, MI 49240
(734) 475-2200 FAX: (734) 475-1846
http://www.coylab.com

CPG
3 Borinski Road
Lincoln Park, NJ 07035
(800) 362-2740 FAX: (973) 305-0884
(973) 305-8181
http://www.cpg-biotech.com

CPL Scientific
43 Kingfisher Court
Hambridge Road
Newbury RG14 5SJ, UK
(44) 1635-574902
FAX: (44) 1635-529322
http://www.cplscientific.co.uk

CraMar Technologies
8670 Wolff Court, #160
Westminster, CO 80030
(800) 4-TOMTEC
http://www.cramar.com

Crescent Chemical
1324 Motor Parkway
Hauppauge, NY 11788
(800) 877-3225 FAX: (631) 348-0913
(631) 348-0333
http://www.creschem.com

Crist Instrument
P.O. Box 128
10200 Moxley Road
Damascus, MD 20872
(301) 253-2184 FAX: (301) 253-0069
http://www.cristinstrument.com

Cruachem
See Annovis
http://www.cruachem.com

CS Bio
1300 Industrial Road
San Carlos, CA 94070
(800) 627-2461 FAX: (415) 802-0944
(415) 802-0880
http://www.csbio.com

CS-Chromatographie Service
Am Parir 27
D-52379 Langerwehe, Germany
(49) 2423-40493-0
FAX: (49) 2423-40493-49
http://www.cs-chromatographie.de

Cuno
400 Research Parkway
Meriden, CT 06450
(800) 231-2259 FAX: (203) 238-8716
(203) 237-5541
http://www.cuno.com

Curtin Matheson Scientific
9999 Veterans Memorial Drive
Houston, TX 77038
(800) 392-3353 FAX: (713) 878-3598
(713) 878-3500

CWE
124 Sibley Avenue
Ardmore, PA 19003
(610) 642-7719 FAX: (610) 642-1532
http://www.cwe-inc.com

Cybex Computer Products
4991 Corporate Drive
Huntsville, AL 35805
(800) 932-9239 FAX: (800) 462-9239
http://www.cybex.com

Cygnus Technology
P.O. Box 219
Delaware Water Gap, PA 18327
(570) 424-5701 FAX: (570) 424-5630
http://www.cygnustech.com

Cymbus Biotechnology
Eagle Class, Chandler's Ford
Hampshire SO53 4NF, UK
(44) 1-703-267-676
FAX: (44) 1-703-267-677
http://www.biotech@cymbus.com

Cytogen
600 College Road East
Princeton, NJ 08540
(609) 987-8200 FAX: (609) 987-6450
http://www.cytogen.com

Cytogen Research and Development
89 Bellevue Hill Road
Boston, MA 02132
(617) 325-7774 FAX: (617) 327-2405

CytRx
154 Technology Parkway
Norcross, GA 30092
(800) 345-2987 FAX: (770) 368-0622
(770) 368-9500
http://www.cytrx.com

Dade Behring
Corporate Headquarters
1717 Deerfield Road
Deerfield, IL 60015
(847) 267-5300 FAX: (847) 267-1066
http://www.dadebehring.com

Dagan
2855 Park Avenue
Minneapolis, MN 55407
(612) 827-5959 FAX: (612) 827-6535
http://www.dagan.com

Dako
6392 Via Real
Carpinteria, CA 93013
(800) 235-5763 FAX: (805) 566-6688
(805) 566-6655
http://www.dakousa.com

Dako A/S
42 Produktionsvej
P.O. Box 1359
DK-2600 Glostrup, Denmark
(45) 4492-0044 FAX: (45) 4284-1822

Dakopatts
See Dako A/S

Dalton Chemical Laboratoris
349 Wildcat Road
Toronto, Ontario
M3J 253 Canada
(416) 661-2102 FAX: (416) 661-2108
(800) 567-5060 (in Canada only)
http://www.dalton.com

Damon, IEC
See Thermoquest

Dan Kar Scientific
150 West Street
Wilmington, MA 01887
(800) 942-5542 FAX: (978) 658-0380
(978) 988-9696
http://www.dan-kar.com

DataCell
Falcon Business Park
40 Ivanhoe Road
Finchampstead, Berkshire
RG40 4QQ, UK
(44) 1189 324324
FAX: (44) 1189 324325
http://www.datacell.co.uk
In the US:
(408) 446-3575 FAX: (408) 446-3589
http://www.datacell.com

DataWave Technologies
380 Main Street, Suite 209
Longmont, CO 80501
(800) 736-9283 FAX: (303) 776-8531
(303) 776-8214

Datex-Ohmeda
3030 Ohmeda Drive
Madison, WI 53718
(800) 345-2700 FAX: (608) 222-9147
(608) 221-1551
http://www.us.datex-ohmeda.com

DATU
82 State Street
Geneva, NY 14456
(315) 787-2240 FAX: (315) 787-2397
http://www.nysaes.cornell.edu/datu

David Kopf Instruments
7324 Elmo Street
P.O. Box 636
Tujunga, CA 91043
(818) 352-3274 FAX: (818) 352-3139

Decagon Devices
P.O. Box 835
950 NE Nelson Court
Pullman, WA 99163
(800) 755-2751 FAX: (509) 332-5158
(509) 332-2756
http://www.decagon.com

Decon Labs
890 Country Line Road
Bryn Mawr, PA 19010
(800) 332-6647 FAX: (610) 964-0650
(610) 520-0610
http://www.deconlabs.com

Decon Laboratories
Conway Street
Hove, Sussex BN3 3LY, UK
(44) 1273 739241
FAX: (44) 1273 722088

Degussa
Precious Metals Division
3900 South Clinton Avenue
South Plainfield, NJ 07080
(800) DEGUSSA FAX: (908) 756-7176
(908) 561-1100
http://www.degussa-huls.com

Deneba Software
1150 NW 72nd Avenue
Miami, FL 33126
(305) 596-5644 FAX: (305) 273-9069
http://www.deneba.com

Deseret Medical
524 West 3615 South
Salt Lake City, UT 84115
(801) 270-8440 FAX: (801) 293-9000

Devcon Plexus
30 Endicott Street
Danvers, MA 01923
(800) 626-7226 FAX: (978) 774-0516
(978) 777-1100
http://www.devcon.com

Developmental Studies Hybridoma Bank
University of Iowa
436 Biology Building
Iowa City, IA 52242
(319) 335-3826 FAX: (319) 335-2077
http://www.uiowa.edu/~dshbwww

DeVilbiss
Division of Sunrise Medical Respiratory
100 DeVilbiss Drive
P.O. Box 635
Somerset, PA 15501
(800) 338-1988 FAX: (814) 443-7572
(814) 443-4881
http://www.sunrisemedical.com

Dharmacon Research
1376 Miners Drive #101
Lafayette, CO 80026
(303) 604-9499 FAX: (303) 604-9680
http://www.dharmacom.com

DiaCheM
Triangle Biomedical
Gardiners Place
West Gillibrands, Lancashire
WN8 9SP, UK
(44) 1695-555581
FAX: (44) 1695-555518
http://www.diachem.co.uk

Diagen
Max-Volmer Strasse 4
D-40724 Hilden, Germany
(49) 2103-892-230
FAX: (49) 2103-892-222

Diagnostic Concepts
6104 Madison Court
Morton Grove, IL 60053
(847) 604-0957

Diagnostic Developments
See DiaCheM

Diagnostic Instruments
6540 Burroughs
Sterling Heights, MI 48314
(810) 731-6000 FAX: (810) 731-6469
http://www.diaginc.com

Diamedix
2140 North Miami Avenue
Miami, FL 33127
(800) 327-4565 FAX: (305) 324-2395
(305) 324-2300

DiaSorin
1990 Industrial Boulevard
Stillwater, MN 55082
(800) 328-1482 FAX: (651) 779-7847
(651) 439-9719
http://www.diasorin.com

Diatome US
321 Morris Road
Fort Washington, PA 19034
(800) 523-5874 FAX: (215) 646-8931
(215) 646-1478
http://www.emsdiasum.com

Difco Laboratories
See Becton Dickinson

Digene
1201 Clopper Road
Gaithersburg, MD 20878
(301) 944-7000 (800) 344-3631
FAX: (301) 944-7121
http://www.digene.com

Digi-Key
701 Brooks Avenue South
Thief River Falls, MN 56701
(800) 344-4539 FAX: (218) 681-3380
(218) 681-6674
http://www.digi-key.com

Digitimer
37 Hydeway
Welwyn Garden City, Hertfordshire
AL7 3BE, UK
(44) 1707-328347
FAX: (44) 1707-373153
http://www.digitimer.com

Dimco-Gray
8200 South Suburban Road
Dayton, OH 45458
(800) 876-8353 FAX: (937) 433-0520
(937) 433-7600
http://www.dimco-gray.com

Dionex
1228 Titan Way
P.O. Box 3603
Sunnyvale, CA 94088
(408) 737-0700 FAX: (408) 730-9403
http://dionex2.promptu.com

Display Systems Biotech
1260 Liberty Way, Suite B
Vista, CA 92083
(800) 697-1111 FAX: (760) 599-9930
(760) 599-0598
http://www.displaysystems.com

Diversified Biotech
1208 VFW Parkway
Boston, MA 02132
(617) 965-8557 FAX: (617) 323-5641
(800) 796-9199
http://www.divbio.com

DNA ProScan
P.O. Box 121585
Nashville, TN 37212
(800) 841-4362 FAX: (615) 292-1436
(615) 298-3524
http://www.dnapro.com

DNAStar
1228 South Park Street
Madison, WI 53715
(608) 258-7420 FAX: (608) 258-7439
http://www.dnastar.com

DNAVIEW
Attn: Charles Brenner
http://www.wco.com
~cbrenner/dnaview.htm

Doall NYC
36-06 48th Avenue
Long Island City, NY 11101
(718) 392-4595 FAX: (718) 392-6115
http://www.doall.com

Dojindo Molecular Technologies
211 Perry Street Parkway, Suite 5
Gaitherbusburg, MD 20877
(877) 987-2667
http://www.dojindo.com

Dolla Eastern
See Doall NYC

Dolan Jenner Industries
678 Andover Street
Lawrence, MA 08143
(978) 681-8000 (978) 682-2500
http://www.dolan-jenner.com

Dow Chemical
Customer Service Center
2040 Willard H. Dow Center
Midland, MI 48674
(800) 232-2436 FAX: (517) 832-1190
(409) 238-9321
http://www.dow.com

Dow Corning
Northern Europe
Meriden Business Park
Copse Drive
Allesley, Coventry CV5 9RG, UK
(44) 1676 528 000
FAX: (44) 1676 528 001

Dow Corning
P.O. Box 994
Midland, MI 48686
(517) 496-4000
http://www.dowcorning.com

Dow Corning (Lubricants)
2200 West Salzburg Road
Auburn, MI 48611
(800) 248-2481 FAX: (517) 496-6974
(517) 496-6000

Dremel
4915 21st Street
Racine, WI 53406
(414) 554-1390
http://www.dremel.com

Drummond Scientific
500 Parkway
P.O. Box 700
Broomall, PA 19008
(800) 523-7480 FAX: (610) 353-6204
(610) 353-0200
http://www.drummondsci.com

Duchefa Biochemie BV
P.O. Box 2281
2002 CG Haarlem, The Netherlands
31-0-23-5319093
FAX: 31-0-23-5318027
http://www.duchefa.com

Duke Scientific
2463 Faber Place
Palo Alto, CA 94303
(800) 334-3883 FAX: (650) 424-1158
(650) 424-1177
http://www.dukescientific.com

Duke University Marine Laboratory
135 Duke Marine Lab Road
Beaufort, NC 28516-9721
(252) 504-7503 FAX: (252) 504-7648
http://www.env.duke.edu/marinelab

DuPont Biotechnology Systems
See NEN Life Science Products

DuPont Medical Products
See NEN Life Science Products

DuPont Merck Pharmaceuticals
331 Treble Cove Road
Billerica, MA 01862
(800) 225-1572 FAX: (508) 436-7501
http://www.dupontmerck.com

DuPont NEN Products
See NEN Life Science Products

Dynal
5 Delaware Drive
Lake Success, NY 11042
(800) 638-9416 FAX: (516) 326-3298
(516) 326-3270
http://www.dynal.net

Dynal AS
Ullernchausen 52,
0379 Oslo, Norway
47-22-06-10-00 FAX: 47-22-50-70-15
http://www.dynal.no

Dynalab
P.O. Box 112
Rochester, NY 14692
(800) 828-6595 FAX: (716) 334-9496
(716) 334-2060
http://www.dynalab.com

Dynarex
1 International Boulevard
Brewster, NY 10509
(888) DYNAREX FAX: (914) 279-9601
(914) 279-9600
http://www.dynarex.com

Dynatech
See Dynex Technologies

Dynex Technologies
14340 Sullyfield Circle
Chantilly, VA 22021
(800) 336-4543 FAX: (703) 631-7816
(703) 631-7800
http://www.dynextechnologies.com

Dyno Mill
See Willy A. Bachofen

E.S.A.
22 Alpha Road
Chelmsford, MA 01824
(508) 250-7000 FAX: (508) 250-7090

E.W. Wright
760 Durham Road
Guilford, CT 06437
(203) 453-6410 FAX: (203) 458-6901
http://www.ewwright.com

E-Y Laboratories
107 N. Amphlett Boulevard
San Mateo, CA 94401
(800) 821-0044 FAX: (650) 342-2648
(650) 342-3296
http://www.eylabs.com

Eastman Kodak
1001 Lee Road
Rochester, NY 14650
(800) 225-5352 FAX: (800) 879-4979
(716) 722-5780 FAX: (716) 477-8040
http://www.kodak.com

ECACC
See European Collection of Animal Cell Cultures

EC Apparatus
See Savant/EC Apparatus

Ecogen, SRL
Gensura Laboratories
Ptge. Dos de Maig
9(08041) Barcelona, Spain
(34) 3-450-2601 FAX: (34) 3-456-0607
http://www.ecogen.com

Ecolab
370 North Wabasha Street
St. Paul, MN 55102
(800) 35-CLEAN FAX: (651) 225-3098
(651) 352-5326
http://www.ecolab.com

ECO PHYSICS
3915 Research Park Drive, Suite A-3
Ann Arbor, MI 48108
(734) 998-1600 FAX: (734) 998-1180
http://www.ecophysics.com

Edge Biosystems
19208 Orbit Drive
Gaithersburg, MD 20879-4149
(800) 326-2685 FAX: (301) 990-0881
(301) 990-2685
http://www.edgebio.com

Edmund Scientific
101 E. Gloucester Pike
Barrington, NJ 08007
(800) 728-6999 FAX: (856) 573-6263
(856) 573-6250
http://www.edsci.com

EG&G
See Perkin-Elmer

Ekagen
969 C Industry Road
San Carlos, CA 94070
(650) 592-4500 FAX: (650) 592-4500

Elcatech
P.O. Box 10935
Winston-Salem, NC 27108
(336) 544-8613 FAX: (336) 777-3623
(910) 777-3624
http://www.elcatech.com

Electron Microscopy Sciences
321 Morris Road
Fort Washington, PA 19034
(800) 523-5874 FAX: (215) 646-8931
(215) 646-1566
http://www.emsdiasum.com

Electron Tubes
100 Forge Way, Unit F
Rockaway, NJ 07866
(800) 521-8382 FAX: (973) 586-9771
(973) 586-9594
http://www.electrontubes.com

Elicay Laboratory Products, (UK) Ltd.
4 Manborough Mews
Crockford Lane
Basingstoke, Hampshire
RG 248NA, England
(256) 811-118 FAX: (256) 811-116
http://www.elkay-uk.co.uk

Eli Lilly
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285
(800) 545-5979 FAX: (317) 276-2095
(317) 276-2000
http://www.lilly.com

ELISA Technologies
See Neogen

Elkins-Sinn
See Wyeth-Ayerst

EMBI
See European Bioinformatics Institute

EM Science
480 Democrat Road
Gibbstown, NJ 08027
(800) 222-0342 FAX: (856) 423-4389
(856) 423-6300
http://www.emscience.com

EM Separations Technology
See R & S Technology

Endogen
30 Commerce Way
Woburn, MA 01801
(800) 487-4885 FAX: (617) 439-0355
(781) 937-0890
http://www.endogen.com

ENGEL-Loter
HSGM Heatcutting Equipment & Machines
1865 E. Main Street, No. 5
Duncan, SC 29334
(888) 854-HSGM FAX: (864) 486-8383
(864) 486-8300
http://www.engelgmbh.com

Enzo Diagnostics
60 Executive Boulevard
Farmingdale, NY 11735
(800) 221-7705 FAX: (516) 694-7501
(516) 694-7070
http://www.enzo.com

Enzogenetics
4197 NW Douglas Avenue
Corvallis, OR 97330
(541) 757-0288

The Enzyme Center
See Charm Sciences

Enzyme Systems Products
486 Lindbergh Avenue
Livermore, CA 94550
(888) 449-2664 FAX: (925) 449-1866
(925) 449-2664
http://www.enzymesys.com

Epicentre Technologies
1402 Emil Street
Madison, WI 53713
(800) 284-8474 FAX: (608) 258-3088
(608) 258-3080
http://www.epicentre.com

Erie Scientific
20 Post Road
Portsmouth, NH 03801
(888) ERIE-SCI FAX: (603) 431-8996
(603) 431-8410
http://www.eriesci.com

ES Industries
701 South Route 73
West Berlin, NJ 08091
(800) 356-6140 FAX: (856) 753-8484
(856) 753-8400
http://www.esind.com

ESA
22 Alpha Road
Chelmsford, MA 01824
(800) 959-5095 FAX: (978) 250-7090
(978) 250-7000
http://www.esainc.com

Ethicon
Route 22, P.O. Box 151
Somerville, NJ 08876
(908) 218-0707
http://www.ethiconinc.com

Ethicon Endo-Surgery
4545 Creek Road
Cincinnati, OH 45242
(800) 766-9534 FAX: (513) 786-7080

Eurogentec
Parc Scientifique du Sart Tilman
4102 Seraing, Belgium
32-4-240-76-76 FAX: 32-4-264-07-88
http://www.eurogentec.com

European Bioinformatics Institute
Wellcome Trust Genomes Campus
Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK
(44) 1223-49444
FAX: (44) 1223-494468

European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC)
Centre for Applied Microbiology & Research
Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, UK
(44) 1980-612 512
FAX: (44) 1980-611 315
http://www.camr.org.uk

Evergreen Scientific
2254 E. 49th Street
P.O. Box 58248
Los Angeles, CA 90058
(800) 421-6261 FAX: (323) 581-2503
(323) 583-1331
http://www.evergreensci.com

Exalpha Biologicals
20 Hampden Street
Boston, MA 02205
(800) 395-1137 FAX: (617) 969-3872
(617) 558-3625
http://www.exalpha.com

Exciton
P.O. Box 31126
Dayton, OH 45437
(937) 252-2989 FAX: (937) 258-3937
http://www.exciton.com

Extrasynthese
ZI Lyon Nord
SA-BP62
69730 Genay, France
(33) 78-98-20-34
FAX: (33) 78-98-19-45

Factor II
1972 Forest Avenue
P.O. Box 1339
Lakeside, AZ 85929
(800) 332-8688 FAX: (520) 537-8066
(520) 537-8387
http://www.factor2.com

Falcon
See Becton Dickinson Labware

Febit AG
Kafertaler Strasse 190
D-68167 Mannheim
Germany
(49) 621-3804-0
FAX: (49) 621-3804-400
http://www.febit.com

Fenwal
See Baxter Healthcare

Filemaker
5201 Patrick Henry Drive
Santa Clara, CA 95054
(408) 987-7000 (800) 325-2747

Fine Science Tools
202-277 Mountain Highway
North Vancouver, British Columbia
V7J 3P2 Canada
(800) 665-5355 FAX: (800) 665 4544
(604) 980-2481 FAX: (604) 987-3299

Fine Science Tools
373-G Vintage Park Drive
Foster City, CA 94404
(800) 521-2109 FAX: (800) 523-2109
(650) 349-1636 FAX: (630) 349-3729

Fine Science Tools
Fahrtgasse 7-13
D-69117 Heidelberg, Germany
(49) 6221 905050
FAX: (49) 6221 600001
http://www.finescience.com

Finn Aqua
AMSCO Finn Aqua Oy
Teollisuustiez, FIN-04300
Tuusula, Finland
358 025851 FAX: 358 0276019

Finnigan
355 River Oaks Parkway
San Jose, CA 95134
(408) 433-4800 FAX: (408) 433-4821
http://www.finnigan.com

Dr. L. Fischer
Lutherstrasse 25A
D-69120 Heidelberg
Germany
(49) 6221-16-0368
http://home.eplus-online.de/
electroporation

Fisher Chemical Company
Fisher Scientific Limited
112 Colonnade Road
Nepean, Ontario K2E 7L6 Canada
(800) 234-7437 FAX: (800) 463-2996
http://www.fisherscientific.com

Fisher Scientific
2000 Park Lane
Pittsburgh, PA 15275
(800) 766-7000 FAX: (800) 926-1166
(412) 562-8300
http://www3.fishersci.com

W.F. Fisher & Son
220 Evans Way, Suite #1
Somerville, NJ 08876
(908) 707-4050 FAX: (908) 707-4099

Fitzco
5600 Pioneer Creek Drive
Maple Plain, MN 55359
(800) 367-8760 FAX: (612) 479-2880
(612) 479-3489
http://www.fitzco.com

5 Prime → 3 Prime
See 2000 Eppendorf-5 Prime
http://www.5prime.com

Flambeau
15981 Valplast Road
Middlefield, Ohio 44062
(800) 232-3474 FAX: (440) 632-1581
(440) 632-1631
http://www.flambeau.com

Fleisch (Rusch)
2450 Meadowbrook Parkway
Duluth, GA 30096
(770) 623-0816 FAX: (770) 623-1829
http://ruschinc.com

Flow Cytometry Standards
P.O. Box 194344
San Juan, PR 00919
(800) 227-8143 FAX: (787) 758-3267
(787) 753-9341
http://www.fcstd.com

Flow Labs
See ICN Biomedicals

Flow-Tech Supply
P.O. Box 1388
Orange, TX 77631
(409) 882-0306 FAX: (409) 882-0254
http://www.flow-tech.com

Fluid Marketing
See Fluid Metering

Fluid Metering
5 Aerial Way, Suite 500
Sayosett, NY 11791
(516) 922-6050 FAX: (516) 624-8261
http://www.fmipump.com

Fluorochrome
1801 Williams, Suite 300
Denver, CO 80264
(303) 394-1000 FAX: (303) 321-1119

Fluka Chemical
See Sigma-Aldrich

FMC BioPolymer
1735 Market Street
Philadelphia, PA 19103
(215) 299-6000 FAX: (215) 299-5809
http://www.fmc.com

FMC BioProducts
191 Thomaston Street
Rockland, ME 04841
(800) 521-0390 FAX: (800) 362-1133
(207) 594-3400 FAX: (207) 594-3426
http://www.bioproducts.com

Forma Scientific
Milcreek Road
P.O. Box 649
Marietta, OH 45750
(800) 848-3080 FAX: (740) 372-6770
(740) 373-4765
http://www.forma.com

Fort Dodge Animal Health
800 5th Street NW
Fort Dodge, IA 50501
(800) 685-5656 FAX: (515) 955-9193
(515) 955-4600
http://www.ahp.com

Fotodyne
950 Walnut Ridge Drive
Hartland, WI 53029
(800) 362-3686 FAX: (800) 362-3642
(262) 369-7000 FAX: (262) 369-7013
http://www.fotodyne.com

Fresenius HemoCare
6675 185th Avenue NE, Suite 100
Redwood, WA 98052
(800) 909-3872
(425) 497-1197
http://www.freseniusht.com

Fresenius Hemotechnology
See Fresenius HemoCare

Fuji Medical Systems
419 West Avenue
P.O. Box 120035
Stamford, CT 06902
(800) 431-1850 FAX: (203) 353-0926
(203) 324-2000
http://www.fujimed.com

Fujisawa USA
Parkway Center North
Deerfield, IL 60015-2548
(847) 317-1088 FAX: (847) 317-7298

Ernest F. Fullam
900 Albany Shaker Road
Latham, NY 12110
(800) 833-4024 FAX: (518) 785-8647
(518) 785-5533
http://www.fullam.com

Gallard-Schlesinger Industries
777 Zechendorf Boulevard
Garden City, NY 11530
(516) 229-4000 FAX: (516) 229-4015
http://www.gallard-schlessinger.com

Gambro
Box 7373
SE 103 91 Stockholm, Sweden
(46) 8 613 65 00
FAX: (46) 8 611 37 31
In the US: **COBE Laboratories**
225 Union Boulevard
Lakewood, CO 80215
(303) 232-6800 FAX: (303) 231-4915
http://www.gambro.com

Garner Glass
177 Indian Hill Boulevard
Claremont, CA 91711
(909) 624-5071 FAX: (909) 625-0173
http://www.garnerglass.com

Garon Plastics
16 Byre Avenue
Somerton Park, South Australia 5044
(08) 8294-5126 FAX: (08) 8376-1487
http://www.apache.airnet.com.au/~garon

Garren Scientific
9400 Lurline Avenue, Unit E
Chatsworth, CA 91311
(800) 342-3725 FAX: (818) 882-3229
(818) 882-6544
http://www.garren-scientific.com

GATC Biotech AG
Jakob-Stadler-Platz 7
D-78467 Constance, Germany
(49) 07531-8160-0
FAX: (49) 07531-8160-81
http://www.gatc-biotech.com

Gaussian
Carnegie Office Park
Building 6, Suite 230
Carnegie, PA 15106
(412) 279-6700 FAX: (412) 279-2118
http://www.gaussian.com

G.C. Electronics/A.R.C. Electronics
431 Second Street
Henderson, KY 42420
(270) 827-8981 FAX: (270) 827-8256
http://www.arcelectronics.com

GDB (Genome Data Base, Curation)
2024 East Monument Street, Suite 1200
Baltimore, MD 21205
(410) 955-9705 FAX: (410) 614-0434
http://www.gdb.org

GDB (Genome Data Base, Home)
Hospital for Sick Children
555 University Avenue
Toronto, Ontario
M5G 1X8 Canada
(416) 813-8744 FAX: (416) 813-8755
http://www.gdb.org

Gelman Sciences
See Pall-Gelman

Gemini BioProducts
5115-M Douglas Fir Road
Calabasas, CA 90403
(818) 591-3530 FAX: (818) 591-7084

Gen Trak
5100 Campus Drive
Plymouth Meeting, PA 19462
(800) 221-7407 FAX: (215) 941-9498
(215) 825-5115
http://www.informagen.com

Genaissance Pharmaceuticals
5 Science Park
New Haven, CT 06511
(800) 678-9487 FAX: (203) 562-9377
(203) 773-1450
http://www.genaissance.com

GENAXIS Biotechnology
Parc Technologique
10 Avenue Ampere
Montigny le Bretoneux
78180 France
(33) 01-30-14-00-20
FAX: (33) 01-30-14-00-15
http://www.genaxis.com

GenBank
National Center for Biotechnology Information
National Library of Medicine/NIH
Building 38A, Room 8N805
8600 Rockville Pike
Bethesda, MD 20894
(301) 496-2475 FAX: (301) 480-9241
http://www.ncbi.nlm.nih.gov

Gene Codes
640 Avis Drive
Ann Arbor, MI 48108
(800) 497-4939 FAX: (734) 930-0145
(734) 769-7249
http://www.genecodes.com

Genemachines
935 Washington Street
San Carlos, CA 94070
(650) 508-1634 FAX: (650) 508-1644
(877) 855-4363
http://www.genemachines.com

Genentech
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
(800) 551-2231 FAX: (650) 225-1600
(650) 225-1000
http://www.gene.com

General Scanning/GSI Luminomics
500 Arsenal Street
Watertown, MA 02172
(617) 924-1010 FAX: (617) 924-7327
http://www.genescan.com

General Valve
Division of Parker Hannifin Pneutronics
19 Gloria Lane
Fairfield, NJ 07004
(800) GVC-VALV
FAX: (800) GVC-1-FAX
http://www.pneutronics.com

Genespan
19310 North Creek Parkway, Suite 100
Bothell, WA 98011
(800) 231-2215 FAX: (425) 482-3005
(425) 482-3003
http://www.genespan.com

Gene Therapy Systems
10190 Telesis Court
San Diego, CA 92122
(858) 457-1919 FAX: (858) 623-9494
http://www.genetherapysystems.com

Genethon Human Genome Research Center
1 bis rue de l'Internationale
91000 Evry, France
(33) 169-472828
FAX: (33) 607-78698
http://www.genethon.fr

Genetic Microsystems
34 Commerce Way
Wobum, MA 01801
(781) 932-9333 FAX: (781) 932-9433
http://www.genticmicro.com

Genetic Mutant Repository
See Coriell Institute for Medical Research

Genetic Research Instrumentation
Gene House
Queenborough Lane
Rayne, Braintree, Essex CM7 8TF, UK
(44) 1376 332900
FAX: (44) 1376 344724
http://www.gri.co.uk

Genetics Computer Group
575 Science Drive
Madison, WI 53711
(608) 231-5200 FAX: (608) 231-5202
http://www.gcg.com

Genetics Institute/American Home Products
87 Cambridge Park Drive
Cambridge, MA 02140
(617) 876-1170 FAX: (617) 876-0388
http://www.genetics.com

Genetix
63-69 Somerford Road
Christchurch, Dorset BH23 3QA, UK
(44) (0) 1202 483900
FAX: (44)(0) 1202 480289
In the US: (877) 436 3849
US FAX: (888) 522 7499
http://www.genetix.co.uk

Gene Tools
One Summerton Way
Philomath, OR 97370
(541) 9292-7840 FAX: (541) 9292-7841
http://www.gene-tools.com

Geneva Bioinformatics (GeneBio) S.A.
25 Avenue de Champel
CH—1206 Geneva, Switzerland
(41) 22-702-9900
FAX: (41) 22-702-9999
http://www.genebio.com

GeneWorks
P.O. Box 11, Rundle Mall
Adelaide, South Australia 5000, Australia
1800 882 555 FAX: (08) 8234 2699
(08) 8234 2644
http://www.geneworks.com

Genome Systems (INCYTE)
4633 World Parkway Circle
St. Louis, MO 63134
(800) 430-0030 FAX: (314) 427-3324
(314) 427-3222
http://www.genomesystems.com

Genomic Solutions
4355 Varsity Drive, Suite E
Ann Arbor, MI 48108
(877) GENOMIC FAX: (734) 975-4808
(734) 975-4800
http://www.genomicsolutions.com

Genomyx
See Beckman Coulter

Genosys Biotechnologies
1442 Lake Front Circle, Suite 185
The Woodlands, TX 77380
(281) 363-3693 FAX: (281) 363-2212
http://www.genosys.com

Genotech
92 Weldon Parkway
St. Louis, MO 63043
(800) 628-7730 FAX: (314) 991-1504
(314) 991-6034

GENSET
876 Prospect Street, Suite 206
La Jolla, CA 92037
(800) 551-5291 FAX: (619) 551-2041
(619) 515-3061
http://www.genset.fr

Gensia Laboratories Ltd.
19 Hughes
Irvine, CA 92718
(714) 455-4700 FAX: (714) 855-8210

Genta
99 Hayden Avenue, Suite 200
Lexington, MA 02421
(781) 860-5150 FAX: (781) 860-5137
http://www.genta.com

GENTEST
6 Henshaw Street
Woburn, MA 01801
(800) 334-5229 FAX: (888) 242-2226
(781) 935-5115 FAX: (781) 932-6855
http://www.gentest.com

Gentra Systems
15200 25th Avenue N., Suite 104
Minneapolis, MN 55447
(800) 866-3039 FAX: (612) 476-5850
(612) 476-5858
http://www.gentra.com

Genzyme
1 Kendall Square
Cambridge, MA 02139
(617) 252-7500 FAX: (617) 252-7600
http://www.genzyme.com
See also R&D Systems

Genzyme Genetics
One Mountain Road
Framingham, MA 01701
(800) 255-7357 FAX: (508) 872-9080
(508) 872-8400
http://www.genzyme.com

George Tiemann & Co.
25 Plant Avenue
Hauppauge, NY 11788
(516) 273-0005 FAX: (516) 273-6199

GIBCO/BRL
A Division of Life Technologies
1 Kendall Square
Grand Island, NY 14072
(800) 874-4226 FAX: (800) 352-1968
(716) 774-6700
http://www.lifetech.com

Gilmont Instruments
A Division of Barnant Company
28N092 Commercial Avenue
Barrington, IL 60010
(800) 637-3739 FAX: (708) 381-7053
http://barnant.com

Gilson
3000 West Beltline Highway
P.O. Box 620027
Middletown, WI 53562
(800) 445-7661
(608) 836-1551
http://www.gilson.com

Glas-Col Apparatus
P.O. Box 2128
Terre Haute, IN 47802
(800) Glas-Col FAX: (812) 234-6975
(812) 235-6167
http://www.glascol.com

Glaxo Wellcome
Five Moore Drive
Research Triangle Park, NC 27709
(800) SGL-AXO5 FAX: (919) 248-2386
(919) 248-2100
http://www.glaxowellcome.com

Glen Mills
395 Allwood Road
Clifton, NJ 07012
(973) 777-0777 FAX: (973) 777-0070
http://www.glenmills.com

Glen Research
22825 Davis Drive
Sterling, VA 20166
(800) 327-4536 FAX: (800) 934-2490
(703) 437-6191 FAX: (703) 435-9774
http://www.glenresearch.com

Glo Germ
P.O. Box 189
Moab, UT 84532
(800) 842-6622 FAX: (435) 259-5930
http://www.glogerm.com

Glyco
11 Pimentel Court
Novato, CA 94949
(800) 722-2597 FAX: (415) 382-3511
(415) 884-6799
http://www.glyco.com

Gould Instrument Systems
8333 Rockside Road
Valley View, OH 44125
(216) 328-7000 FAX: (216) 328-7400
http://www.gould13.com

Gralab Instruments
See Dimco-Gray

GraphPad Software
5755 Oberlin Drive #110
San Diego, CA 92121
(800) 388-4723 FAX: (558) 457-8141
(558) 457-3909
http://www.graphpad.com

Graseby Anderson
See Andersen Instruments
http://www.graseby.com

Grass Instrument
A Division of Astro-Med
600 East Greenwich Avenue
W. Warwick, RI 02893
(800) 225-5167 FAX: (877) 472-7749
http://www.grassinstruments.com

Greenacre and Misac Instruments
Misac Systems
27 Port Wood Road
Ware, Hertfordshire SF12 9NJ, UK
(44) 1920 463017
FAX: (44) 1920 465136

Greer Labs
639 Nuway Circle
Lenois, NC 28645
(704) 754-5237
http://greerlabs.com

Greiner
Maybachestrasse 2
Postfach 1162
D-7443 Frickenhausen, Germany
(49) 0 91 31/80 79 0
FAX: (49) 0 91 31/80 79 30
http://www.erlangen.com/greiner

GSI Lumonics
130 Lombard Street
Oxnard, CA 93030
(805) 485-5559 FAX: (805) 485-3310
http://www.gsilumonics.com

GTE Internetworking
150 Cambridge Park Drive
Cambridge, MA 02140
(800) 472-4565 FAX: (508) 694-4861
http://www.bbn.com

GW Instruments
35 Medford Street
Somerville, MA 02143
(617) 625-4096 FAX: (617) 625-1322
http://www.gwinst.com

H & H Woodworking
1002 Garfield Street
Denver, CO 80206
(303) 394-3764

Hacker Instruments
17 Sherwood Lane
P.O. Box 10033
Fairfield , NJ 07004
800-442-2537 FAX: (973) 808-8281
(973) 226-8450
http://www.hackerinstruments.com

Haemenetics
400 Wood Road
Braintree, MA 02184
(800) 225-5297 FAX: (781) 848-7921
(781) 848-7100
http://www.haemenetics.com

Halocarbon Products
P.O. Box 661
River Edge, NJ 07661
(201) 242-8899 FAX: (201) 262-0019
http://halocarbon.com

Hamamatsu Photonic Systems
A Division of Hamamatsu
360 Foothill Road
P.O. Box 6910
Bridgewater, NJ 08807
(908) 231-1116 FAX: (908) 231-0852
http://www.photonicsonline.com

Hamilton Company
4970 Energy Way
P.O. Box 10030
Reno, NV 89520
(800) 648-5950 FAX: (775) 856-7259
(775) 858-3000
http://www.hamiltoncompany.com

Hamilton Thorne Biosciences
100 Cummings Center, Suite 102C
Beverly, MA 01915
http://www.hamiltonthorne.com

Hampton Research
27631 El Lazo Road
Laguna Niguel, CA 92677
(800) 452-3899 FAX: (949) 425-1611
(949) 425-6321
http://www.hamptonresearch.com

Harlan Bioproducts for Science
P.O. Box 29176
Indianapolis, IN 46229
(317) 894-7521 FAX: (317) 894-1840
http://www.hbps.com

Harlan Sera-Lab
Hillcrest, Dodgeford Lane
Belton, Loughborough
Leicester LE12 9TE, UK
(44) 1530 222123
FAX: (44) 1530 224970
http://www.harlan.com

Harlan Teklad
P.O. Box 44220
Madison, WI 53744
(608) 277-2070 FAX: (608) 277-2066
http://www.harlan.com

Harrick Scientific Corporation
88 Broadway
Ossining, NY 10562
(914) 762-0020 FAX: (914) 762-0914
http://www.harricksci.com

Harrison Research
840 Moana Court
Palo Alto, CA 94306
(650) 949-1565 FAX: (650) 948-0493

Harvard Apparatus
84 October Hill Road
Holliston, MA 01746
(800) 272-2775 FAX: (508) 429-5732
(508) 893-8999
http://harvardapparatus.com

Harvard Bioscience
See Harvard Apparatus

Haselton Biologics
See JRH Biosciences

Hazelton Research Products
See Covance Research Products

Health Products
See Pierce Chemical

Heat Systems-Ultrasonics
1938 New Highway
Farmingdale, NY 11735
(800) 645-9846 FAX: (516) 694-9412
(516) 694-9555

Heidenhain Corp
333 East State Parkway
Schaumberg, IL 60173
(847) 490-1191 FAX: (847) 490-3931
http://www.heidenhain.com

HEKA Instruments
33 Valley Rd.
Southboro, MA 01960
(866) 742-0606 FAX: (508) 481-8945
http://www.heka.com

Hellma Cells
11831 Queens Boulevard
Forest Hills, NY 11375
(718) 544-9166 FAX: (718) 263-6910
http://www.helmaUSA.com

Hellma
Postfach 1163
D-79371 Mullheim/Baden, Germany
(49) 7631-1820
FAX: (49) 7631-13546
http://www.hellma-worldwide.de

Henry Schein
135 Duryea Road, Mail Room 150
Melville, NY 11747
(800) 472-4346 FAX: (516) 843-5652
http://www.henryschein.com

Heraeus Kulzer
4315 South Lafayette Boulevard
South Bend, IN 46614
(800) 343-5336
(219) 291-0661
http://www.kulzer.com

Heraeus Sepatech
See Kendro Laboratory Products

Hercules Aqualon
Aqualon Division
Hercules Research Center, Bldg. 8145
500 Hercules Road
Wilmington, DE 19899
(800) 345-0447 FAX: (302) 995-4787
http://www.herc.com/aqualon/pharma

Heto-Holten A/S
Gydevang 17-19
DK-3450 Allerod, Denmark
(45) 48-16-62-00
FAX: (45) 48-16-62-97
Distributed by ATR

Hettich-Zentrifugen
See Andreas Hettich

Hewlett-Packard
3000 Hanover Street
Mailstop 20B3
Palo Alto, CA 94304
(650) 857-1501 FAX: (650) 857-5518
http://www.hp.com

HGS Hinimoto Plastics
1-10-24 Meguro-Honcho
Megurouko
Tokyo 152, Japan
3-3714-7226 FAX: 3-3714-4657

Hitachi Scientific Instruments
Nissei Sangyo America
8100 N. First Street
San Elsa, CA 95314
(800) 548-9001 FAX: (408) 432-0704
(408) 432-0520
http://www.hii.hitachi.com

Hi-Tech Scientific
Brunel Road
Salisbury, Wiltshire, SP2 7PU
UK
(44) 1722-432320
(800) 344-0724 (US only)
http://www.hi-techsci.co.uk

Hoechst AG
See Aventis Pharmaceutical

Hoefer Scientific Instruments
Division of Amersham-Pharmacia
Biotech
800 Centennial Avenue
Piscataway, NJ 08855
(800) 227-4750 FAX: (877) 295-8102
http://www.apbiotech.com

Hoffman-LaRoche
340 Kingsland Street
Nutley, NJ 07110
(800) 526-0189 FAX: (973) 235-9605
(973) 235-5000
http://www.rocheUSA.com

Holborn Surgical and Medical Instruments
Westwood Industrial Estate
Ramsgate Road
Margate, Kent CT9 4JZ UK
(44) 1843 296666
FAX: (44) 1843 295446

Honeywell
101 Columbia Road
Morristown, NJ 07962
(973) 455-2000 FAX: (973) 455-4807
http://www.honeywell.com

Honeywell Specialty Films
P.O. Box 1039
101 Columbia Road
Morristown, NJ 07962
(800) 934-5679 FAX: (973) 455-6045
http://www.honeywell-specialtyfilms.com

Hood Thermo-Pad Canada
Comp. 20, Site 61A, RR2
Summerland, British Columbia
V0H 1Z0 Canada
(800) 665-9555 FAX: (250) 494-5003
(250) 494-5002
http://www.thermopad.com

Horiba Instruments
17671 Armstrong Avenue
Irvine, CA 92714
(949) 250-4811 FAX: (949) 250-0924
http://www.horiba.com

Hoskins Manufacturing
10776 Hall Road
P.O. Box 218
Hamburg, MI 48139
(810) 231-1900 FAX: (810) 231-4311
http://www.hoskinsmfgco.com

Hosokawa Micron Powder Systems
10 Chatham Road
Summit, NJ 07901
(800) 526-4491 FAX: (908) 273-7432
(908) 273-6360
http://www.hosokawamicron.com

HT Biotechnology
Unit 4
61 Ditton Walk
Cambridge CB5 8QD, UK
(44) 1223-412583

Hugo Sachs Electronik
Postfach 138
7806 March-Hugstetten, Germany
D-79229(49) 7665-92000
FAX: (49) 7665-920090

Human Biologics International
7150 East Camelback Road, Suite 245
Scottsdale, AZ 85251
(480) 990-2005 FAX: (480)-990-2155
http://www.humanbiological.com

Human Genetic Mutant Cell Repository
See Coriell Institute for
Medical Research

HVS Image
P.O. Box 100
Hampton, Middlesex TW12 2YD, UK
FAX: (44) 208 783 1223
In the US: (800) 225-9261
FAX: (888) 483-8033
http://www.hvsimage.com

Hybaid
111-113 Waldegrave Road
Teddington, Middlesex TW11 8LL, UK
(44) 0 1784 42500
FAX: (44) 0 1784 248085
http://www.hybaid.co.uk

Hybaid Instruments
8 East Forge Parkway
Franklin, MA 02028
(888)4-HYBAID FAX: (508) 541-3041
(508) 541-6918
http://www.hybaid.com

Hybridon
155 Fortune Boulevard
Milford, MA 01757
(508) 482-7500 FAX: (508) 482-7510
http://www.hybridon.com

HyClone Laboratories
1725 South HyClone Road
Logan, UT 84321
(800) HYCLONE FAX: (800) 533-9450
(801) 753-4584 FAX: (801) 750-0809
http://www.hyclone.com

Hyseq
670 Almanor Avenue
Sunnyvale, CA 94086
(408) 524-8100 FAX: (408) 524-8141
http://www.hyseq.com

IBA GmbH
1508 South Grand Blvd.
St. Louis, MO 63104
(877) 422-4624 FAX: (888) 531-6813
http://www.iba-go.com

IBF Biotechnics
See Sepracor

IBI (International Biotechnologies)
See Eastman Kodak
For technical service (800) 243-2555
(203) 786-5600

ICN Biochemicals
See ICN Biomedicals

ICN Biomedicals
3300 Hyland Avenue
Costa Mesa, CA 92626
(800) 854-0530 FAX: (800) 334-6999
(714) 545-0100 FAX: (714) 641-7275
http://www.icnbiomed.com

ICN Flow and Pharmaceuticals
See ICN Biomedicals

ICN Immunobiochemicals
See ICN Biomedicals

ICN Radiochemicals
See ICN Biomedicals

ICONIX
100 King Street West, Suite 3825
Toronto, Ontario
M5X 1E3 Canada
(416) 410-2411 FAX: (416) 368-3089
http://www.iconix.com

ICRT (Imperial Cancer Research Technology)
Sardinia House
Sardinia Street
London WC2A 3NL, UK
(44) 1712-421136
FAX: (44) 1718-314991

Idea Scientific Company
P.O. Box 13210
Minneapolis, MN 55414
(800) 433-2535 FAX: (612) 331-4217
http://www.ideascientific.com

IEC
See International Equipment Co.

IITC
23924 Victory Boulevard
Woodland Hills, CA 91367
(888) 414-4482 (818) 710-1556
FAX: (818) 992-5185
http://www.iitcinc.com

IKA Works
2635 N. Chase Parkway, SE
Wilmington, NC 28405
(910) 452-7059 FAX: (910) 452-7693
http://www.ika.net

Ikegami Electronics
37 Brook Avenue
Maywood, NJ 07607
(201) 368-9171 FAX: (201) 569-1626

Ikemoto Scientific Technology
25-11 Hongo
3-chome, Bunkyo-ku
Tokyo 101-0025, Japan
(81) 3-3811-4181
FAX: (81) 3-3811-1960

Imagenetics
See ATC Diagnostics

Imaging Research
c/o Brock University
500 Glenridge Avenue
St. Catharines, Ontario
L2S 3A1 Canada
(905) 688-2040 FAX: (905) 685-5861
http://www.imaging.brocku.ca

Imclone Systems
180 Varick Street
New York, NY 10014
(212) 645-1405 FAX: (212) 645-2054
http://www.imclone.com

IMCO Corporation LTD., AB
P.O. Box 21195
SE-100 31
Stockholm, Sweden
46-8-33-53-09 FAX: 46-8-728-47-76
http://www.imcocorp.se

Imgenex Corporation
11175 Flintkote Avenue
Suite E
San Diego, CA 92121
(888) 723-4363 FAX: (858) 642-0937
(858) 642.0978
http://www.imgenex.com

IMICO
Calle Vivero, No. 5-4a Planta
E-28040, Madrid, Spain
(34) 1-535-3960 FAX: (34) 1-535-2780

Immunex
51 University Street
Seattle, WA 98101
(206) 587-0430 FAX: (206) 587-0606
http://www.immunex.com

Immunochemistry Technologies
9401 James Avenue, South
Suite 155
Bloomington, MN 55431
(800) 829-3194 FAX: (952) 888-8988
(952) 888-8788
http://www.immunochemistry.com

Immunocorp
1582 W. Deere Avenue
Suite C
Irvine, CA 92606
(800) 446-3063
http://www.immunocorp.com

Immunotech
130, av. Delattre de Tassigny
B.P. 177
13276 Marseilles Cedex 9
France
(33) 491-17-27-00
FAX: (33) 491-41-43-58
http://www.immunotech.fr

Imperial Chemical Industries
Imperial Chemical House
Millbank, London SW1P 3JF, UK
(44) 171-834-4444
FAX: (44)171-834-2042
http://www.ici.com

Inceltech
See New Brunswick Scientific

Incstar
See DiaSorin

Incyte
6519 Dumbarton Circle
Fremont, CA 94555
(510) 739-2100 FAX: (510) 739-2200
http://www.incyte.com

Incyte Pharmaceuticals
3160 Porter Drive
Palo Alto, CA 94304
(877) 746-2983 FAX: (650) 855-0572
(650) 855-0555
http://www.incyte.com

Individual Monitoring Systems
6310 Harford Road
Baltimore, MD 21214

Indo Fine Chemical
P.O. Box 473
Somerville, NJ 08876
(888) 463-6346 FAX: (908) 359-1179
(908) 359-6778
http://www.indofinechemical.com

Industrial Acoustics
1160 Commerce Avenue
Bronx, NY 10462
(718) 931-8000 FAX: (718) 863-1138
http://www.industrialacoustics.com

Inex Pharmaceuticals
100-8900 Glenlyon Parkway
Glenlyon Business Park
Burnaby, British Columbia
V5J 5J8 Canada
(604) 419-3200 FAX: (604) 419-3201
http://www.inexpharm.com

Ingold, Mettler, Toledo
261 Ballardvale Street
Wilmington, MA 01887
(800) 352-8763 FAX: (978) 658-0020
(978) 658-7615
http://www.mt.com

Innogenetics N.V.
Technologie Park 6
B-9052 Zwijnaarde
Belgium
(32) 9-329-1329 FAX: (32) 9-245-7623
http://www.innogenetics.com

Innovative Medical Services
1725 Gillespie Way
El Cajon, CA 92020
(619) 596-8600 FAX: (619) 596-8700
http://www.imspure.com

Innovative Research
3025 Harbor Lane N, Suite 300
Plymouth, MN 55447
(612) 519-0105　FAX: (612) 519-0239
http://www.inres.com

Innovative Research of America
2 N. Tamiami Trail, Suite 404
Sarasota, FL 34236
(800) 421-8171　FAX: (800) 643-4345
(941) 365-1406　FAX: (941) 365-1703
http://www.innovrsrch.com

Inotech Biosystems
15713 Crabbs Branch Way, #110
Rockville, MD 20855
(800) 635-4070　FAX: (301) 670-2859
(301) 670-2850
http://www.inotechintl.com

INOVISION
22699 Old Canal Road
Yorba Linda, CA 92887
(714) 998-9600　FAX: (714) 998-9666
http://www.inovision.com

Instech Laboratories
5209 Militia Hill Road
Plymouth Meeting, PA 19462
(800) 443-4227　FAX: (610) 941-0134
(610) 941-0132
http://www.instechlabs.com

Instron
100 Royall Street
Canton, MA 02021
(800) 564-8378　FAX: (781) 575-5725
(781) 575-5000
http://www.instron.com

Instrumentarium
P.O. Box 300
00031 Instrumentarium
Helsinki, Finland
(10) 394-5566
http://www.instrumentarium.fi

Instruments SA
Division Jobin Yvon
16-18 Rue du Canal
91165 Longjumeau, Cedex, France
(33)1 6454-1300
FAX: (33)1 6909-9319
http://www.isainc.com

Instrutech
20 Vanderventer Avenue, Suite 101E
Port Washington, NY 11050
(516) 883-1300　FAX: (516) 883-1558
http://www.instrutech.com

Integrated DNA Technologies
1710 Commercial Park
Coralville, IA 52241
(800) 328-2661　FAX: (319) 626-8444
http://www.idtdna.com

Integrated Genetics
See Genzyme Genetics

Integrated Scientific Imaging Systems
3463 State Street, Suite 431
Santa Barbara, CA 93105
(805) 692-2390　FAX: (805) 692-2391
http://www.imagingsystems.com

Integrated Separation Systems (ISS)
See OWL Separation Systems

IntelliGenetics
See Oxford Molecular Group

Interactiva BioTechnologie
Sedanstrasse 10
D-89077 Ulm, Germany
(49) 731-93579-290
FAX: (49) 731-93579-291
http://www.interactiva.de

Interchim
213 J.F. Kennedy Avenue
B.P. 1140
Montlucon
03103 France
(33) 04-70-03-83-55
FAX: (33) 04-70-03-93-60

Interfocus
14/15 Spring Rise
Falcover Road
Haverhill, Suffolk CB9 7XU, UK
(44) 1440 703460
FAX: (44) 1440 704397
http://www.interfocus.ltd.uk

Intergen
2 Manhattanville Road
Purchase, NY 10577
(800) 431-4505　FAX: (800) 468-7436
(914) 694-1700　FAX: (914) 694-1429
http://www.intergenco.com

Intermountain Scientific
420 N. Keys Drive
Kaysville, UT 84037
(800) 999-2901　FAX: (800) 574-7892
(801) 547-5047　FAX: (801) 547-5051
http://www.bioexpress.com

International Biotechnologies (IBI)
See Eastman Kodak

International Equipment Co. (IEC)
See Thermoquest

International Institute for the Advancement of Medicine
1232 Mid-Valley Drive
Jessup, PA 18434
(800) 486-IIAM　FAX: (570) 343-6993
(570) 496-3400
http://www.iiam.org

International Light
17 Graf Road
Newburyport, MA 01950
(978) 465-5923　FAX: (978) 462-0759

International Market Supply (I.M.S.)
Dane Mill
Broadhurst Lane
Congleton, Cheshire CW12 1LA, UK
(44) 1260 275469
FAX: (44) 1260 276007

International Marketing Services
See International Marketing Ventures

International Marketing Ventures
6301 Ivy Lane, Suite 408
Greenbelt, MD 20770
(800) 373-0096　FAX: (301) 345-0631
(301) 345-2866
http://www.imvlimited.com

International Products
201 Connecticut Drive
Burlington, NJ 08016
(609) 386-8770　FAX: (609) 386-8438
http://www.mkt@ipcol.com

Intracel Corporation
Bartels Division
2005 Sammamish Road, Suite 107
Issaquah, WA 98027
(800) 542-2281　FAX: (425) 557-1894
(425) 392-2992
http://www.intracel.com

Invitrogen
1600 Faraday Avenue
Carlsbad, CA 92008
(800) 955-6288　FAX: (760) 603-7201
(760) 603-7200
http://www.invitrogen.com

In Vivo Metric
P.O. Box 249
Healdsburg, CA 95448
(707) 433-4819　FAX: (707) 433-2407

IRORI
9640 Towne Center Drive
San Diego, CA 92121
(858) 546-1300　FAX: (858) 546-3083
http://www.irori.com

Irvine Scientific
2511 Daimler Street
Santa Ana, CA 92705
(800) 577-6097　FAX: (949) 261-6522
(949) 261-7800
http://www.irvinesci.com

ISC BioExpress
420 North Kays Drive
Kaysville, UT 84037
(800) 999-2901　FAX: (800) 574-7892
(801) 547-5047
http://www.bioexpress.com

ISCO
P.O. Box 5347
4700 Superior
Lincoln, NE 68505
(800) 228-4373　FAX: (402) 464-0318
(402) 464-0231
http://www.isco.com

Isis Pharmaceuticals
Carlsbad Research Center
2292 Faraday Avenue
Carlsbad, CA 92008
(760) 931-9200
http://www.isip.com

Isolabs
See Wallac

ISS
See Integrated Separation Systems

J & W Scientific
See Agilent Technologies

J.A. Webster
86 Leominster Road
Sterling , MA 01564
(800) 225-7911 FAX: (978) 422-8959
http://www.jawebster.com

J.T. Baker
See Mallinckrodt Baker
222 Red School Lane
Phillipsburg, NJ 08865
(800) JTBAKER FAX: (908) 859-6974
http://www.jtbaker.com

Jackson ImmunoResearch
Laboratories
P.O. Box 9
872 W. Baltimore Pike
West Grove, PA 19390
(800) 367-5296 FAX: (610) 869-0171
(610) 869-4024
http://www.jacksonimmuno.com

The Jackson Laboratory
600 Maine Street
Bar Harbor, ME 04059
(800) 422-6423 FAX: (207) 288-5079
(207) 288-6000
http://www.jax.org

Jaece Industries
908 Niagara Falls Boulevard
North Tonawanda, NY 14120
(716) 694-2811 FAX: (716) 694-2811
http://www.jaece.com

Jandel Scientific
See SPSS

Janke & Kunkel
See Ika Works

Janssen Life Sciences Products
See Amersham

Janssen Pharmaceutica
1125 Trenton-Harbourton Road
Titusville, NJ 09560
(609) 730-2577 FAX: (609) 730-2116
http://us.janssen.com

Jasco
8649 Commerce Drive
Easton, MD 21601
(800) 333-5272 FAX: (410) 822-7526
(410) 822-1220
http://www.jascoinc.com

Jena Bioscience
Loebstedter Str. 78
07749 Jena, Germany
(49) 3641-464920
FAX: (49) 3641-464991
http://www.jenabioscience.com

Jencons Scientific
800 Bursca Drive, Suite 801
Bridgeville, PA 15017
(800) 846-9959 FAX: (412) 257-8809
(412) 257-8861
http://www.jencons.co.uk

JEOL Instruments
11 Dearborn Road
Peabody, MA 01960
(978) 535-5900 FAX: (978) 536-2205
http://www.jeol.com/index.html

Jewett
750 Grant Street
Buffalo, NY 14213
(800) 879-7767 FAX: (716) 881-6092
(716) 881-0030
http://www.JewettInc.com

John's Scientific
See VWR Scientific

John Weiss and Sons
95 Alston Drive
Bradwell Abbey
Milton Keynes, Buckinghamshire
MK1 4HF UK
(44) 1908-318017
FAX: (44) 1908-318708

Johnson & Johnson Medical
2500 Arbrook Boulevard East
Arlington, TX 76004
(800) 423-4018
http://www.jnjmedical.com

Johnston Matthey Chemicals
Orchard Road
Royston, Hertfordshire SG8 5HE, UK
(44) 1763-253000
FAX: (44) 1763-253466
http://www.chemicals.matthey.com

Jolley Consulting and Research
683 E. Center Street, Unit H
Grayslake, IL 60030
(847) 548-2330 FAX: (847) 548-2984
http://www.jolley.com

Jordan Scientific
See Shelton Scientific

Jorgensen Laboratories
1450 N. Van Buren Avenue
Loveland, CO 80538
(800) 525-5614 FAX: (970) 663-5042
(970) 669-2500
http://www.jorvet.com

JRH Biosciences and JR Scientific
13804 W. 107th Street
Lenexa, KS 66215
(800) 231-3735 FAX: (913) 469-5584
(913) 469-5580

Jule Bio Technologies
25 Science Park, #14, Suite 695
New Haven, CT 06511
(800) 648-1772 FAX: (203) 786-5489
(203) 786-5490
http://hometown.aol.com/precastgel/
index.htm

K.R. Anderson
2800 Bowers Avenue
Santa Clara, CA 95051
(800) 538-8712 FAX: (408) 727-2959
(408) 727-2800
http://www.kranderson.com

Kabi Pharmacia Diagnostics
See Pharmacia Diagnostics

Kanthal H.P. Reid
1 Commerce Boulevard
P.O. Box 352440
Palm Coast, FL 32135
(904) 445-2000 FAX: (904) 446-2244
http://www.kanthal.com

Kapak
5305 Parkdale Drive
St. Louis Park, MN 55416
(800) KAPAK-57 FAX: (612) 541-0735
(612) 541-0730
http://www.kapak.com

Karl Hecht
Stettener Str. 22-24
D-97647 Sondheim
Rhon, Germany
(49) 9779-8080 FAX: (49) 9779-80888

Karl Storz
Koningin-Elisabeth Str. 60
D-14059 Berlin, Germany
(49) 30-30 69 09-0
FAX: (49) 30-30 19 452
http://www.karlstorz.de

KaVo EWL
P.O. Box 1320
D-88293 Leutkirch im Allgau, Germany
(49) 7561-86-0 FAX: (49) 7561-86-371
http://www.kavo.com/english/
startseite.htm

Keithley Instruments
28775 Aurora Road
Cleveland, OH 44139
(800) 552-1115 FAX: (440) 248-6168
(440) 248-0400
http://www.keithley.com

Kemin
2100 Maury Street, Box 70
Des Moines, IA 50301
(515) 266-2111 FAX: (515) 266-8354
http://www.kemin.com

Kemo
3 Brook Court, Blakeney Road
Beckenham, Kent BR3 1HG, UK
(44) 0181 658 3838
FAX: (44) 0181 658 4084
http://www.kemo.com

Kendall
15 Hampshire Street
Mansfield, MA 02048
(800) 962-9888 FAX: (800) 724-1324
http://www.kendallhq.com

Kendro Laboratory Products
31 Pecks Lane
Newtown, CT 06470
(800) 522-SPIN FAX: (203) 270-2166
(203) 270-2080
http://www.kendro.com

Kendro Laboratory Products
P.O. Box 1220
Am Kalkberg
D-3360 Osterod, Germany
(55) 22-316-213
FAX: (55) 22-316-202
http://www.heraeus-instruments.de

Kent Laboratories
23404 NE 8th Street
Redmond, WA 98053
(425) 868-6200 FAX: (425) 868-6335
http://www.kentlabs.com

Kent Scientific
457 Bantam Road, #16
Litchfield, CT 06759
(888) 572-8887 FAX: (860) 567-4201
(860) 567-5496
http://www.kentscientific.com

Keuffel & Esser
See Azon

Keystone Scientific
Penn Eagle Industrial Park
320 Rolling Ridge Drive
Bellefonte, PA 16823
(800) 437-2999 FAX: (814) 353-2305
(814) 353-2300 Ext 1
http://www.keystonescientific.com

Kimble/Kontes Biotechnology
1022 Spruce Street
P.O. Box 729
Vineland, NJ 08360
(888) 546-2531 FAX: (856) 794-9762
(856) 692-3600
http://www.kimble-kontes.com

Kinematica AG
Luzernerstrasse 147a
CH-6014 Littau-Luzern, Switzerland
(41) 41 2501257 FAX: (41) 41 2501460
http://www.kinematica.ch

Kin-Tek
504 Laurel Street
LaMarque, TX 77568
(800) 326-3627
FAX: (409) 938-3710
http://www.kin-tek.com

Kipp & Zonen
125 Wilbur Place
Bohemia, NY 11716
(800) 645-2065 FAX: (516) 589-2068
(516) 589-2885
http://www.kippzonen.thomasregister.com/olc/kippzonen

Kirkegaard & Perry Laboratories
2 Cessna Court
Gaithersburg, MD 20879
(800) 638-3167 FAX: (301) 948-0169
(301) 948-7755
http://www.kpl.com

Kodak
See Eastman Kodak

Kontes Glass
See Kimble/Kontes Biotechnology

Kontron Instruments AG
Postfach CH-8010
Zurich, Switzerland
41-1-733-5733 FAX: 41-1-733-5734

David Kopf Instruments
P.O. Box 636
Tujunga, CA 91043
(818) 352-3274 FAX: (818) 352-3139

Kraft Apparatus
See Glas-Col Apparatus

Kramer Scientific Corporation
711 Executive Boulevard
Valley Cottage, NY 10989
(845) 267-5050 FAX: (845) 267-5550

Kulite Semiconductor Products
1 Willow Tree Road
Leonia, NJ 07605
(201) 461-0900 FAX: (201) 461-0990
http://www.kulite.com

Lab-Line Instruments
15th & Bloomingdale Avenues
Melrose Park, IL 60160
(800) LAB-LINE FAX: (708) 450-5830
FAX: (800) 450-4LAB
http://www.labline.com

Lab Products
742 Sussex Avenue
P.O. Box 639
Seaford, DE 19973
(800) 526-0469 FAX: (302) 628-4309
(302) 628-4300
http://www.labproductsinc.com

LabRepco
101 Witmer Road, Suite 700
Horsham, PA 19044
(800) 521-0754 FAX: (215) 442-9202
http://www.labrepco.com

Lab Safety Supply
P.O. Box 1368
Janesville, WI 53547
(800) 356-0783 FAX: (800) 543-9910
(608) 754-7160 FAX: (608) 754-1806
http://www.labsafety.com

Lab-Tek Products
See Nalge Nunc International

Labconco
8811 Prospect Avenue
Kansas City, MO 64132
(800) 821-5525 FAX: (816) 363-0130
(816) 333-8811
http://www.labconco.com

Labindustries
See Barnstead/Thermolyne

Labnet International
P.O. Box 841
Woodbridge, NJ 07095
(888) LAB-NET1 FAX: (732) 417-1750
(732) 417-0700
http://www.nationallabnet.com

LABO-MODERNE
37 rue Dombasle
Paris
75015 France
(33) 01-45-32-62-54
FAX: (33) 01-45-32-01-09
http://www.labomoderne.com/fr

Laboratory of Immunoregulation
National Institute of Allergy and Infectious Diseases/NIH
9000 Rockville Pike
Building 10, Room 11B13
Bethesda, MD 20892
(301) 496-1124

Laboratory Supplies
29 Jefry Lane
Hicksville, NY 11801
(516) 681-7711

Labscan Limited
Stillorgan Industrial Park
Stillorgan
Dublin, Ireland
(353) 1-295-2684
FAX: (353) 1-295-2685
http://www.labscan.ie

Labsystems
See Thermo Labsystems

Labsystems Affinity Sensors
Saxon Way, Bar Hill
Cambridge CB3 8SL, UK
44 (0) 1954 789976
FAX: 44 (0) 1954 789417
http://www.affinity-sensors.com

Labtronics
546 Governors Road
Guelph, Ontario
N1K 1E3 Canada
(519) 763-4930　FAX: (519) 836-4431
http://www.labtronics.com

Labtronix Manufacturing
3200 Investment Boulevard
Hayward, CA 94545
(510) 786-3200　FAX: (510) 786-3268
http://www.labtronix.com

Lafayette Instrument
3700 Sagamore Parkway North
P.O. Box 5729
Lafayette, IN 47903
(800) 428-7545　FAX: (765) 423-4111
(765) 423-1505
http://www.lafayetteinstrument.com

Lambert Instruments
Turfweg 4
9313 TH Leutingewolde
The Netherlands
(31) 50-5018461　FAX: (31)
50-5010034
http://www.lambert-instruments.com

Lampire Biological Laboratories
P.O. Box 270
Pipersville, PA 18947
(215) 795-2538　FAX: (215) 795-0237
http://www.lampire.com

Lancaster Synthesis
P.O. Box 1000
Windham, NH 03087
(800) 238-2324　FAX: (603) 889-3326
(603) 889-3306
http://www.lancastersynthesis-us.com

Lancer
140 State Road 419
Winter Springs, FL 32708
(800) 332-1855　FAX: (407) 327-1229
(407) 327-8488
http://www.lancer.com

LaVision GmbH
Gerhard-Gerdes-Str. 3
D-37079
Goettingen, Germany
(49) 551-50549-0
FAX: (49) 551-50549-11
http://www.lavision.de

Lawshe
See Advanced Process Supply

Laxotan
20, rue Leon Blum
26000 Valence, France
(33) 4-75-41-91-91
FAX: (33) 4-75-41-91-99
http://www.latoxan.com

LC Laboratories
165 New Boston Street
Woburn, MA 01801
(781) 937-0777　FAX: (781) 938-5420
http://www.lclaboratories.com

LC Packings
80 Carolina Street
San Francisco, CA 94103
(415) 552-1855　FAX: (415) 552-1859
http://www.lcpackings.com

LC Services
See LC Laboratories

LECO
3000 Lakeview Avenue
St. Joseph, MI 49085
(800) 292-6141　FAX: (616) 982-8977
(616) 985-5496
http://www.leco.com

Lederle Laboratories
See Wyeth-Ayerst

Lee Biomolecular Research
Laboratories
11211 Sorrento Valley Road, Suite M
San Diego, CA 92121
(858) 452-7700

The Lee Company
2 Pettipaug Road
P.O. Box 424
Westbrook, CT 06498
(800) LEE-PLUG　FAX: (860) 399-7058
(860) 399-6281
http://www.theleeco.com

Lee Laboratories
1475 Athens Highway
Grayson, GA 30017
(800) 732-9150　FAX: (770) 979-9570
(770) 972-4450
http://www.leelabs.com

Leica
111 Deer Lake Road
Deerfield, IL 60015
(800) 248-0123　FAX: (847) 405-0147
(847) 405-0123
http://www.leica.com

Leica Microsystems
Imneuenheimer Feld 518
D-69120
Heidelberg, Germany
(49) 6221-41480
FAX: (49) 6221-414833
http://www.leica-microsystems.com

Leinco Technologies
359 Consort Drive
St. Louis, MO 63011
(314) 230-9477　FAX: (314) 527-5545
http://www.leinco.com

Leitz U.S.A.
See Leica

LenderKing Metal Products
8370 Jumpers Hole Road
Millersville, MD 21108
(410) 544-8795　FAX: (410) 544-5069
http://www.lenderking.com

Letica Scientific Instruments
Panlab s.i., c/Loreto 50
08029 Barcelona, Spain
(34) 93-419-0709
FAX: (34) 93-419-7145
http://www.panlab-sl.com

Leybold-Heraeus Trivac DZA
5700 Mellon Road
Export, PA 15632
(412) 327-5700

LI-COR
Biotechnology Division
4308 Progressive Avenue
Lincoln, NE 68504
(800) 645-4267　FAX: (402) 467-0819
(402) 467-0700
http://www.licor.com

Life Science Laboratories
See Adaptive Biosystems

Life Science Resources
Two Corporate Center Drive
Melville, NY 11747
(800) 747-9530　FAX: (516) 844-5114
(516) 844-5085
http://www.astrocam.com

Life Sciences
2900 72nd Street North
St. Petersburg, FL 33710
(800) 237-4323　FAX: (727) 347-2957
(727) 345-9371
http://www.lifesci.com

Life Technologies
9800 Medical Center Drive
P.O. Box 6482
Rockville, MD 20849
(800) 828-6686　FAX: (800) 331-2286
http://www.lifetech.com

Lifecodes
550 West Avenue
Stamford, CT 06902
(800) 543-3263　FAX: (203) 328-9599
(203) 328-9500
http://www.lifecodes.com

Lightnin
135 Mt. Read Boulevard
Rochester, NY 14611
(888) MIX-BEST　FAX: (716) 527-1742
(716) 436-5550
http://www.lightnin-mixers.com

Linear Drives
Luckyn Lane, Pipps Hill
Basildon, Essex SS14 3BW, UK
(44) 1268-287070
FAX: (44) 1268-293344
http://www.lineardrives.com

Linscott's Directory
4877 Grange Road
Santa Rosa, CA 95404
(707) 544-9555　FAX: (415) 389-6025
http://www.linscottsdirectory.co.uk

Linton Instrumentation
Unit 11, Forge Business Center
Upper Rose Lane
Palgrave, Diss, Norfolk IP22 1AP, UK
(44) 1-379-651-344
FAX: (44) 1-379-650-970
http://www.lintoninst.co.uk

List Biological Laboratories
501-B Vandell Way
Campbell, CA 95008
(800) 726-3213　FAX: (408) 866-6364
(408) 866-6363
http://www.listlabs.com

LKB Instruments
See Amersham Pharmacia Biotech

Lloyd Laboratories
604 West Thomas Avenue
Shenandoah, IA 51601
(800) 831-0004　FAX: (712) 246-5245
(712) 246-4000
http://www.lloydinc.com

Loctite
1001 Trout Brook Crossing
Rocky Hill, CT 06067
(860) 571-5100　FAX: (860)571-5465
http://www.loctite.com

Lofstrand Labs
7961 Cessna Avenue
Gaithersburg, MD 20879
(800) 541-0362　FAX: (301) 948-9214
(301) 330-0111
http://www.lofstrand.com

Lomir Biochemical
99 East Main Street
Malone, NY 12953
(877) 425-3604　FAX: (518) 483-8195
(518) 483-7697
http://www.lomir.com

LSL Biolafitte
10 rue de Temara
7810C St.-Germain-en-Laye, France
(33) 1-3061-5260
FAX: (33) 1-3061-5234

Ludl Electronic Products
171 Brady Avenue
Hawthorne, NY 10532
(888) 769-6111　FAX: (914) 769-4759
(914) 769-6111
http://www.ludl.com

Lumigen
24485 W. Ten Mile Road
Southfield, MI 48034
(248) 351-5600　FAX: (248) 351-0518
http://www.lumigen.com

Luminex
12212 Technology Boulevard
Austin, TX 78727
(888) 219-8020　FAX: (512) 258-4173
(512) 219-8020
http://www.luminexcorp.com

LYNX Therapeutics
25861 Industrial Boulevard
Hayward, CA 94545
(510) 670-9300　FAX: (510) 670-9302
http://www.lynxgen.com

Lyphomed
3 Parkway North
Deerfield, IL 60015
(847) 317-8100　FAX: (847) 317-8600

M.E.D. Associates
See Med Associates

Macherey-Nagel
6 South Third Street, #402
Easton, PA 18042
(610) 559-9848　FAX: (610) 559-9878
http://www.macherey-nagel.com

Macherey-Nagel
Valencienner Strasse 11
P.O. Box 101352
D-52313 Dueren, Germany
(49) 2421-969141
FAX: (49) 2421-969199
http://www.macherey-nagel.ch

Mac-Mod Analytical
127 Commons Court
Chadds Ford, PA 19317
800-441-7508　FAX: (610) 358-5993
(610) 358-9696
http://www.mac-mod.com

Mallinckrodt Baker
222 Red School Lane
Phillipsburg, NJ 08865
(800) 582-2537　FAX: (908) 859-6974
(908) 859-2151
http://www.mallbaker.com

Mallinckrodt Chemicals
16305 Swingley Ridge Drive
Chesterfield, MD 63017
(314) 530-2172　FAX: (314) 530-2563
http://www.mallchem.com

Malven Instruments
Enigma Business Park
Grovewood Road
Malven, Worchestershire
WR 141 XZ, United Kingdom

Marinus
1500 Pier C Street
Long Beach, CA 90813
(562) 435-6522　FAX: (562) 495-3120

Markson Science
c/o Whatman Labs Sales
P.O. Box 1359
Hillsboro, OR 97123
(800) 942-8626　FAX: (503) 640-9716
(503) 648-0762

Marsh Biomedical Products
565 Blossom Road
Rochester, NY 14610
(800) 445-2812　FAX: (716) 654-4810
(716) 654-4800
http://www.biomar.com

Marshall Farms USA
5800 Lake Bluff Road
North Rose, NY 14516
(315) 587-2295
e-mail: info@marfarms.com

Martek
6480 Dobbin Road
Columbia, MD 21045
(410) 740-0081　FAX: (410) 740-2985
http://www.martekbio.com

Martin Supply
Distributor of Gerber Scientific
2740 Loch Raven Road
Baltimore, MD 21218
(800) 282-5440　FAX: (410) 366-0134
(410) 366-1696

Mast Immunosystems
630 Clyde Court
Mountain View, CA 94043
(800) 233-MAST　FAX: (650) 969-2745
(650) 961-5501
http://www.mastallergy.com

Matheson Gas Products
P.O. Box 624
959 Route 46 East
Parsippany, NJ 07054
(800) 416-2505　FAX: (973) 257-9393
(973) 257-1100
http://www.mathesongas.com

Mathsoft
1700 Westlake Avenue N., Suite 500
Seattle, WA 98109
(800) 569-0123　FAX: (206) 283-8691
(206) 283-8802
http://www.mathsoft.com

Matreya
500 Tressler Street
Pleasant Gap, PA 16823
(814) 359-5060　FAX: (814) 359-5062
http://www.matreya.com

Matrigel
See Becton Dickinson Labware

Matrix Technologies
22 Friars Drive
Hudson, NH 03051
(800) 345-0206 FAX: (603) 595-0106
(603) 595-0505
http://www.matrixtechcorp.com

MatTek Corp.
200 Homer Avenue
Ashland, Massachusetts 01721
(508) 881-6771 FAX: (508) 879-1532
http://www.mattek.com

Maxim Medical
89 Oxford Road
Oxford OX2 9PD
United Kingdom
44 (0)1865-865943
FAX: 44 (0)1865-865291
http://www.maximmed.com

Mayo Clinic
Section on Engineering
Project #ALA-1, 1982
200 1st Street SW
Rochester, MN 55905
(507) 284-2511 FAX: (507) 284-5988

McGaw
See B. Braun-McGaw

McMaster-Carr
600 County Line Road
Elmhurst, IL 60126
(630) 833-0300 FAX: (630) 834-9427
http://www.mcmaster.com

McNeil Pharmaceutical
See Ortho McNeil Pharmaceutical

MCNC
3021 Cornwallis Road
P.O. Box 12889
Research Triangle Park, NC 27709
(919) 248-1800 FAX: (919) 248-1455
http://www.mcnc.org

MD Industries
5 Revere Drive, Suite 415
Northbrook, IL 60062
(800) 421-8370 FAX: (847) 498-2627
(708) 339-6000
http://www.mdindustries.com

MDS Nordion
447 March Road
P.O. Box 13500
Kanata, Ontario
K2K 1X8 Canada
(800) 465-3666 FAX: (613) 592-6937
(613) 592-2790
http://www.mds.nordion.com

MDS Sciex
71 Four Valley Drive
Concord, Ontario
Canada L4K 4V8
(905) 660-9005 FAX: (905) 660-2600
http://www.sciex.com

Mead Johnson
See Bristol-Meyers Squibb

Med Associates
P.O. Box 319
St. Albans, VT 05478
(802) 527-2343 FAX: (802) 527-5095
http://www.med-associates.com

Medecell
239 Liverpool Road
London N1 1LX, UK
(44) 20-7607-2295
FAX: (44) 20-7700-4156
http://www.medicell.co.uk

Media Cybernetics
8484 Georgia Avenue, Suite 200
Silver Spring, MD 20910
(301) 495-3305 FAX: (301) 495-5964
http://www.mediacy.com

Mediatech
13884 Park Center Road
Herndon, VA 20171
(800) cellgro
(703) 471-5955
http://www.cellgro.com

Medical Systems
See Harvard Apparatus

Medifor
647 Washington Street
Port Townsend, WA 98368
(800) 366-3710 FAX: (360) 385-4402
(360) 385-0722
http://www.medifor.com

MedImmune
35 W. Watkins Mill Road
Gaithersburg, MD 20878
(301) 417-0770 FAX: (301) 527-4207
http://www.medimmune.com

MedProbe AS
P.O. Box 2640
St. Hanshaugen
N-0131 Oslo, Norway
(47) 222 00137 FAX: (47) 222 00189
http://www.medprobe.com

Megazyme
Bray Business Park
Bray, County Wicklow
Ireland
(353) 1-286-1220
FAX: (353) 1-286-1264
http://www.megazyme.com

Melles Griot
4601 Nautilus Court South
Boulder, CO 80301
(800) 326-4363 FAX: (303) 581-0960
(303) 581-0337
http://www.mellesgriot.com

Menzel-Glaser
Postfach 3157
D-38021 Braunschweig, Germany
(49) 531 590080
FAX: (49) 531 509799

E. Merck
Frankfurterstrasse 250
D-64293 Darmstadt 1, Germany
(49) 6151-720

Merck
See EM Science

Merck & Company
Merck National Service Center
P.O. Box 4
West Point, PA 19486
(800) NSC-MERCK
(215) 652-5000
http://www.merck.com

Merck Research Laboratories
See Merck & Company

Merck Sharpe Human Health Division
300 Franklin Square Drive
Somerset, NJ 08873
(800) 637-2579 FAX: (732) 805-3960
(732) 805-0300

Merial Limited
115 Transtech Drive
Athens, GA 30601
(800) MERIAL-1 FAX: (706) 548-0608
(706) 548-9292
http://www.merial.com

Meridian Instruments
P.O. Box 1204
Kent, WA 98035
(253) 854-9914 FAX: (253) 854-9902
http://www.minstrument.com

Meta Systems Group
32 Hammond Road
Belmont, MA 02178
(617) 489-9950 FAX: (617) 489-9952

Metachem Technologies
3547 Voyager Street, Bldg. 102
Torrance, CA 90503
(310) 793-2300 FAX: (310) 793-2304
http://www.metachem.com

Metallhantering
Box 47172
100-74 Stockholm, Sweden
(46) 8-726-9696

MethylGene
7220 Frederick-Banting, Suite 200
Montreal, Quebec
H4S 2A1 Canada
http://www.methylgene.com

Metro Scientific
475 Main Street, Suite 2A
Farmingdale, NY 11735
(800) 788-6247　FAX: (516) 293-8549
(516) 293-9656

Metrowerks
980 Metric Boulevard
Austin, TX 78758
(800) 377-5416
(512) 997-4700
http://www.metrowerks.com

Mettler Instruments
Mettler-Toledo
1900 Polaris Parkway
Columbus, OH 43240
(800) METTLER　FAX: (614) 438-4900
http://www.mt.com

Miami Serpentarium Labs
34879 Washington Loop Road
Punta Gorda, FL 33982
(800) 248-5050　FAX: (813) 639-1811
(813) 639-8888
http://www.miamiserpentarium.com

Michrom BioResources
1945 Industrial Drive
Auburn, CA 95603
(530) 888-6498　FAX: (530) 888-8295
http://www.michrom.com

Mickle Laboratory Engineering
Gomshall, Surrey, UK
(44) 1483-202178

Micra Scientific
A division of Eichrom Industries
8205 S. Cass Ave, Suite 111
Darien, IL 60561
(800) 283-4752　FAX: (630) 963-1928
(630) 963-0320
http://www.micrasci.com

MicroBrightField
74 Hegman Avenue
Colchester, VT 05446
(802) 655-9360　FAX: (802) 655-5245
http://www.microbrightfield.com

Micro Essential Laboratory
4224 Avenue H
Brooklyn, NY 11210
(718) 338-3618　FAX: (718) 692-4491

Micro Filtration Systems
7-3-Chome, Honcho
Nihonbashi, Tokyo, Japan
(81) 3-270-3141

Micro-Metrics
P.O. Box 13804
Atlanta, GA 30324
(770) 986-6015　FAX: (770) 986-9510
http://www.micro-metrics.com

Micro-Tech Scientific
140 South Wolfe Road
Sunnyvale, CA 94086
(408) 730-8324　FAX: (408) 730-3566
http://www.microlc.com

Microbix Biosystems
341 Bering Avenue
Toronto, Ontario
M8Z 3A8 Canada
1-800-794-6694　FAX: 416-234-1626
1-416-234-1624
http://www.microbix.com

MicroCal
22 Industrial Drive East
Northampton, MA 01060
(800) 633-3115　FAX: (413) 586-0149
(413) 586-7720
http://www.microcalorimetry.com

Microfluidics
30 Ossipee Road
P.O. Box 9101
Newton, MA 02164
(800) 370-5452　FAX: (617) 965-1213
(617) 969-5452
http://www.microfluidicscorp.com

Microgon
See Spectrum Laboratories

Microlase Optical Systems
West of Scotland Science Park
Kelvin Campus, Maryhill Road
Glasgow G20 0SP, UK
(44) 141-948-1000
FAX: (44) 141-946-6311
http://www.microlase.co.uk

Micron Instruments
4509 Runway Street
Simi Valley, CA 93063
(800) 638-3770　FAX: (805) 522-4982
(805) 552-4676
http://www.microninstruments.com

Micron Separations
See MSI

Micro Photonics
4949 Liberty Lane, Suite 170
P.O. Box 3129
Allentown, PA 18106
(610) 366-7103　FAX: (610) 366-7105
http://www.microphotonics.com

MicroTech
1420 Conchester Highway
Boothwyn, PA 19061
(610) 459-3514

Midland Certified Reagent Company
3112-A West Cuthbert Avenue
Midland, TX 79701
(800) 247-8766　FAX: (800) 359-5789
(915) 694-7950　FAX: (915) 694-2387
http://www.mcrc.com

Midwest Scientific
280 Vance Road
Valley Park, MO 63088
(800) 227-9997　FAX: (636) 225-9998
(636) 225-9997
http://www.midsci.com

Miles
See Bayer

Miles Laboratories
See Serological

Miles Scientific
See Nunc

Millar Instruments
P.O. Box 230227
6001-A Gulf Freeway
Houston, TX 77023
(713) 923-9171　FAX: (713) 923-7757
http://www.millarinstruments.com

MilliGen/Biosearch
See Millipore

Millipore
80 Ashbury Road
P.O. Box 9125
Bedford, MA 01730
(800) 645-5476　FAX: (781) 533-3110
(781) 533-6000
http://www.millipore.com

Miltenyi Biotec
251 Auburn Ravine Road, Suite 208
Auburn, CA 95603
(800) 367-6227　FAX: (530) 888-8925
(530) 888-8871
http://www.miltenyibiotec.com

Miltex
6 Ohio Drive
Lake Success, NY 11042
(800) 645-8000　FAX: (516) 775-7185
(516) 349-0001

Milton Roy
See Spectronic Instruments

Mini-Instruments
15 Burnham Business Park
Springfield Road
Burnham-on-Crouch, Essex CM0 8TE, UK
(44) 1621-783282
FAX: (44) 1621-783132
http://www.mini-instruments.co.uk

Mini Mitter
P.O. Box 3386
Sunriver, OR 97707
(800) 685-2999　FAX: (541) 593-5604
(541) 593-8639
http://www.minimitter.com

Mirus Corporation
505 S. Rosa Road
Suite 104
Madison, WI 53719
(608) 441-2852　FAX: (608) 441-2849
http://www.genetransfer.com

Misonix
1938 New Highway
Farmingdale, NY 11735
(800) 645-9846　FAX: (516) 694-9412
http://www.misonix.com

Mitutoyo (MTI)
See Dolla Eastern

MJ Research
Waltham, MA 02451
(800) PELTIER　FAX: (617) 923-8080
(617) 923-8000
http://www.mjr.com

Modular Instruments
228 West Gay Street
Westchester, PA 19380
(610) 738-1420　FAX: (610) 738-1421
http://www.mi2.com

Molecular Biology Insights
8685 US Highway 24
Cascade, CO 80809-1333
(800) 747-4362　FAX: (719) 684-7989
(719) 684-7988
http://www.oligo.net

Molecular Biosystems
10030 Barnes Canyon Road
San Diego, CA 92121
(858) 452-0681　FAX: (858) 452-6187
http://www.mobi.com

Molecular Devices
1312 Crossman Avenue
Sunnyvale, CA 94089
(800) 635-5577　FAX: (408) 747-3602
(408) 747-1700
http://www.moldev.com

Molecular Designs
1400 Catalina Street
San Leandro, CA 94577
(510) 895-1313　FAX: (510) 614-3608

Molecular Dynamics
928 East Arques Avenue
Sunnyvale, CA 94086
(800) 333-5703　FAX: (408) 773-1493
(408) 773-1222
http://www.apbiotech.com

Molecular Probes
4849 Pitchford Avenue
Eugene, OR 97402
(800) 438-2209　FAX: (800) 438-0228
(541) 465-8300　FAX: (541) 344-6504
http://www.probes.com

Molecular Research Center
5645 Montgomery Road
Cincinnati, OH 45212
(800) 462-9868　FAX: (513) 841-0080
(513) 841-0900
http://www.mrcgene.com

Molecular Simulations
9685 Scranton Road
San Diego, CA 92121
(800) 756-4674　FAX: (858) 458-0136
(858) 458-9990
http://www.msi.com

Monoject Disposable Syringes & Needles/Syrvet
16200 Walnut Street
Waukee, IA 50263
(800) 727-5203　FAX: (515) 987-5553
(515) 987-5554
http://www.syrvet.com

Monsanto Chemical
800 North Lindbergh Boulevard
St. Louis, MO 63167
(314) 694-1000　FAX: (314) 694-7625
http://www.monsanto.com

Moravek Biochemicals
577 Mercury Lane
Brea, CA 92821
(800) 447-0100　FAX: (714) 990-1824
(714) 990-2018
http://www.moravek.com

Moss
P.O. Box 189
Pasadena, MD 21122
(800) 932-6677　FAX: (410) 768-3971
(410) 768-3442
http://www.mosssubstrates.com

Motion Analysis
3617 Westwind Boulevard
Santa Rosa, CA 95403
(707) 579-6500　FAX: (707) 526-0629
http://www.motionanalysis.com

Mott
Farmington Industrial Park
84 Spring Lane
Farmington, CT 06032
(860) 747-6333　FAX: (860) 747-6739
http://www.mottcorp.com

MSI (Micron Separations)
See Osmonics

Multi Channel Systems
Markwiesenstrasse 55
72770 Reutlingen, Germany
(49) 7121-503010
FAX: (49) 7121-503011
http://www.multichannelsystems.com

Multiple Peptide Systems
3550 General Atomics Court
San Diego, CA 92121
(800) 338-4965　FAX: (800) 654-5592
(858) 455-3710　FAX: (858) 455-3713
http://www.mps-sd.com

Murex Diagnostics
3075 Northwoods Circle
Norcross, GA 30071
(707) 662-0660　FAX: (770) 447-4989

MWG-Biotech
Anzinger Str. 7
D-85560 Ebersberg, Germany
(49) 8092-82890　FAX: (49) 8092-21084
http://www.mwg˙biotech.com

Myriad Industries
3454 E Street
San Diego, CA 92102
(800) 999-6777　FAX: (619) 232-4819
(619) 232-6700
http://www.myriadindustries.com

Nacalai Tesque
Nijo Karasuma, Nakagyo-ku
Kyoto 604, Japan
81-75-251-1723
FAX: 81-75-251-1762
http://www.nacalai.co.jp

Nalge Nunc International
Subsidiary of Sybron International
75 Panorama Creek Drive
P.O. Box 20365
Rochester, NY 14602
(800) 625-4327　FAX: (716) 586-8987
(716) 264-9346
http://www.nalgenunc.com

Nanogen
10398 Pacific Center Court
San Diego, CA 92121
(858) 410-4600　FAX: (858) 410-4848
http://www.nanogen.com

Nanoprobes
95 Horse Block Road
Yaphank, NY 11980
(877) 447-6266　FAX: (631) 205-9493
(631) 205-9490
http://www.nanoprobes.com

Narishige USA
1710 Hempstead Turnpike
East Meadow, NY 11554
(800) 445-7914　FAX: (516) 794-0066
(516) 794-8000
http://www.narishige.co.jp

Nasco-Fort Atkinson
P.O. Box 901
901 Janesville Ave.
Fort Atkinson, WI 53538-0901
(800) 558-9595　FAX: (920) 563-8296
http://www.enasco.com

National Bag Company
2233 Old Mill Road
Hudson, OH 44236
(800) 247-6000　FAX: (330) 425-9800
(330) 425-2600
http://www.nationalbag.com

National Band and Tag
Department X 35, Box 72430
Newport, KY 41032
(606) 261-2035　FAX: (800) 261-8247
https://www.nationalband.com

National Biosciences
See Molecular Biology Insights

National Diagnostics
305 Patton Drive
Atlanta, GA 30336
(800) 526-3867　FAX: (404) 699-2077
(404) 699-2121
http://www.nationaldiagnostics.com

National Disease Research Exchange
1880 John F. Kennedy Blvd., 11th Fl.
Philadelphia, PA 19103
(800) 222-6374
http://www.ndri.com

National Institute of Standards and Technology
100 Bureau Drive
Gaithersburg, MD 20899
(301) 975-NIST　FAX: (301) 926-1630
http://www.nist.gov

National Instruments
11500 North Mopac Expressway
Austin, TX 78759
(512) 794-0100　FAX: (512) 683-8411
http://www.ni.com

National Labnet
See Labnet International

National Scientific Instruments
975 Progress Circle
Lawrenceville, GA 300243
(800) 332-3331　FAX: (404) 339-7173
http://www.nationalscientific.com

National Scientific Supply
1111 Francisco Bouldvard East
San Rafael, CA 94901
(800) 525-1779　FAX: (415) 459-2954
(415) 459-6070
http://www.nat-sci.com

Naz-Dar-KC Chicago
Nazdar
1087 N. North Branch Street
Chicago, IL 60622
(800) 736-7636　FAX: (312) 943-8215
(312) 943-8338
http://www.nazdar.com

NB Labs
1918 Avenue A
Denison, TX 75021
(903) 465-2694　FAX: (903) 463-5905
http://www.nblabslarry.com

NEB
See New England Biolabs

NEN Life Science Products
549 Albany Street
Boston, MA 02118
(800) 551-2121　FAX: (617) 451-8185
(617) 350-9075
http://www.nen.com

NEN Research Products, Dupont (UK)
Diagnostics and Biotechnology Systems
Wedgewood Way
Stevenage, Hertfordshire SG1 4QN, UK
44-1438-734831
44-1438-734000
FAX: 44-1438-734836
http://www.dupont.com

Neogen
628 Winchester Road
Lexington, KY 40505
(800) 477-8201　FAX: (606) 255-5532
(606) 254-1221
http://www.neogen.com

Neosystems
380, 11012 Macleod Trail South
Calgary, Alberta
T2J 6A5 Canada
(403) 225-9022　FAX: (403) 225-9025
http://www.neosystems.com

Neuralynx
2434 North Pantano Road
Tucson, AZ 85715
(520) 722-8144　FAX: (520) 722-8163
http://www.neuralynx.com

Neuro Probe
16008 Industrial Drive
Gaithersburg, MD 20877
(301) 417-0014　FAX: (301) 977-5711
http://www.neuroprobe.com

Neurocrine Biosciences
10555 Science Center Drive
San Diego, CA 92121
(619) 658-7600　FAX: (619) 658-7602
http://www.neurocrine.com

Nevtek
HCR03, Box 99
Burnsville, VA 24487
(540) 925-2322　FAX: (540) 925-2323
http://www.nevtek.com

New Brunswick Scientific
44 Talmadge Road
Edison, NJ 08818
(800) 631-5417　FAX: (732) 287-4222
(732) 287-1200
http://www.nbsc.com

New England Biolabs (NEB)
32 Tozer Road
Beverly, MA 01915
(800) 632-5227　FAX: (800) 632-7440
http://www.neb.com

New England Nuclear (NEN)
See NEN Life Science Products

New MBR
Gubelstrasse 48
CH8050 Zurich, Switzerland
(41) 1-313-0703

Newark Electronics
4801 N. Ravenswood Avenue
Chicago, IL 60640
(800) 4-NEWARK　FAX: (773) 907-5339
(773) 784-5100
http://www.newark.com

Newell Rubbermaid
29 E. Stephenson Street
Freeport, IL 61032
(815) 235-4171　FAX: (815) 233-8060
http://www.newellco.com

Newport Biosystems
1860 Trainor Street
Red Bluff, CA 96080
(530) 529-2448　FAX: (530) 529-2648

Newport
1791 Deere Avenue
Irvine, CA 92606
(800) 222-6440　FAX: (949) 253-1800
(949) 253-1462
http://www.newport.com

Nexin Research B.V.
P.O. Box 16
4740 AA Hoeven, The Netherlands
(31) 165-503172
FAX: (31) 165-502291

NIAID
See Bio-Tech Research Laboratories

Nichiryo
230 Route 206
Building 2-2C
Flanders, NJ 07836
(877) 548-6667　FAX: (973) 927-0099
(973) 927-4001
http://www.nichiryo.com

Nichols Institute Diagnostics
33051 Calle Aviador
San Juan Capistrano, CA 92675
(800) 286-4NID　FAX: (949) 240-5273
(949) 728-4610
http://www.nicholsdiag.com

Nichols Scientific Instruments
3334 Brown Station Road
Columbia, MO 65202
(573) 474-5522　FAX: (603) 215-7274
http://home.beseen.com technology/nsi_technology

Nicolet Biomedical Instruments
5225 Verona Road, Building 2
Madison, WI 53711
(800) 356-0007 FAX: (608) 441-2002
(608) 273-5000
http://nicoletbiomedical.com

N.I.G.M.S. (National Institute of General Medical Sciences)
See Coriell Institute for Medical Research

Nikon
Science and Technologies Group
1300 Walt Whitman Road
Melville, NY 11747
(516) 547-8500 FAX: (516) 547-4045
http://www.nikonusa.com

Nippon Gene
1-29, Ton-ya-machi
Toyama 930, Japan
(81) 764-51-6548
FAX: (81) 764-51-6547

Noldus Information Technology
751 Miller Drive
Suite E-5
Leesburg, VA 20175
(800) 355-9541 FAX: (703) 771-0441
(703) 771-0440
http://www.noldus.com

Nonlinear Dynamics
See NovoDynamics

Nordion International
See MDS Nordion

North American Biologicals (NABI)
16500 NW 15th Avenue
Miami, FL 33169
(800) 327-7106 (305) 625-5305
http://www.nabi.com

North American Reiss
See Reiss

Northwestern Bottle
24 Walpole Park South
Walpole, MA 02081
(508) 668-8600 FAX: (508) 668-7790

NOVA Biomedical
Nova Biomedical 200
Prospect Street Waltham, MA 02454
(800) 822-0911 FAX: (781) 894-5915
http://www.novabiomedical.com

Novagen
601 Science Drive
Madison, WI 53711
(800) 526-7319 FAX: (608) 238-1388
(608) 238-6110
http://www.novagen.com

Novartis
59 Route 10
East Hanover, NJ 07936
(800)526-0175 FAX: (973) 781-6356
http://www.novartis.com

Novartis Biotechnology
3054 Cornwallis Road
Research Triangle Park, NC 27709
(888) 462-7288 FAX: (919) 541-8585
http://www.novartis.com

Nova Sina AG
Subsidiary of Airflow Lufttechnik GmbH
Kleine Heeg 21
52259 Rheinbach, Germany
(49) 02226 920-0
FAX: (49) 02226 9205-11

Novex/Invitrogen
1600 Faraday
Carlsbad, CA 92008
(800) 955-6288 FAX: (760) 603-7201
http://www.novex.com

Novo Nordisk Biochem
77 Perry Chapel Church Road
Franklington, NC 27525
(800) 879-6686 FAX: (919) 494-3450
(919) 494-3000
http://www.novo.dk

Novo Nordisk BioLabs
See Novo Nordisk Biochem

Novocastra Labs
Balliol Business Park West
Benton Lane
Newcastle-upon-Tyne
Tyne and Wear NE12 8EW, UK
(44) 191-215-0567
FAX: (44) 191-215-1152
http://www.novocastra.co.uk

NovoDynamics
123 North Ashley Street
Suite 210
Ann Arbor, MI 48104
(734) 205-9100 FAX: (734) 205-9101
http://www.novodynamics.com

Novus Biologicals
P.O. Box 802
Littleton, CO 80160
(888) 506-6887 FAX: (303) 730-1966
http://www.novus-biologicals.com/main.html

NPI Electronic
Hauptstrasse 96
D-71732 Tamm, Germany
(49) 7141-601534
FAX: (49) 7141-601266
http://www.npielectronic.com

NSG Precision Cells
195G Central Avenue
Farmingdale, NY 11735
(516) 249-7474 FAX: (516) 249-8575
http://www.nsgpci.com

Nu Chek Prep
109 West Main
P.O. Box 295
Elysian, MN 56028
(800) 521-7728 FAX: (507) 267-4790
(507) 267-4689

Nuclepore
See Costar

Numonics
101 Commerce Drive
Montgomeryville, PA 18936
(800) 523-6716 FAX: (215) 361-0167
(215) 362-2766
http://www.interactivewhiteboards.com

NYCOMED AS Pharma
c/o Accurate Chemical & Scientific
300 Shames Drive
Westbury, NY 11590
(800) 645-6524 FAX: (516) 997-4948
(516) 333-2221
http://www.accuratechemical.com

Nycomed Amersham
Health Care Division
101 Carnegie Center
Princeton, NJ 08540
(800) 832-4633 FAX: (800) 807-2382
(609) 514-6000
http://www.nycomed-amersham.com

Nyegaard
Herserudsvagen 5254
S-122 06 Lidingo, Sweden
(46) 8-765-2930

Ohmeda Catheter Products
See Datex-Ohmeda

Ohwa Tsusbo
Hiby Dai Building
1-2-2 Uchi Saiwai-cho
Chiyoda-ku
Tokyo 100, Japan
03-3591-7348 FAX: 03-3501-9001

Oligos Etc.
9775 S.W. Commerce Circle, C-6
Wilsonville, OR 97070
(800) 888-2358 FAX: (503) 6822D1635
(503) 6822D1814
http://www.oligoetc.com

Olis Instruments
130 Conway Drive
Bogart, GA 30622
(706) 353-6547 (800) 852-3504
http://www.olisweb.com

Olympus America
2 Corporate Center Drive
Melville, NY 11747
(800) 645-8160　FAX: (516) 844-5959
(516) 844-5000
http://www.olympusamerica.com

Omega Engineering
One Omega Drive
P.O. Box 4047
Stamford, CT 06907
(800) 848-4286　FAX: (203) 359-7700
(203) 359-1660
http://www.omega.com

Omega Optical
3 Grove Street
P.O. Box 573
Brattleboro, VT 05302
(802) 254-2690　FAX: (802) 254-3937
http://www.omegafilters.com

Omnetics Connector Corporation
7260 Commerce Circle
East Minneapolis, MN 55432
(800) 343-0025 (763) 572-0656
Fax: (763) 572-3925
http://www.omnetics.com/main.htm

Omni International
6530 Commerce Court
Warrenton, VA 20187
(800) 776-4431　FAX: (540) 347-5352
(540) 347-5331
http://www.omni-inc.com

Omnion
2010 Energy Drive
P.O. Box 879
East Troy, WI 53120
(262) 642-7200　FAX: (262) 642-7760
http://www.omnion.com

Omnitech Electronics
See AccuScan Instruments

Oncogene Research Products
P.O. Box Box 12087
La Jolla, CA 92039-2087
(800) 662-2616　FAX: (800) 766-0999
http://www.apoptosis.com

Oncogene Science
See OSI Pharmaceuticals

Oncor
See Intergen

Online Instruments
130 Conway Drive, Suites A & B
Bogart, GA 30622
(800) 852-3504 (706) 353-1972
(706) 353-6547
http://www.olisweb.com

Operon Technologies
1000 Atlantic Avenue
Alameda, CA 94501
(800) 688-2248　FAX: (510) 865-5225
(510) 865-8644
http://www.operon.com

Optiscan
P.O. Box 1066
Mount Waverly MDC, Victoria
Australia 3149
61-3-9538 3333　FAX: 61-3-9562 7742
http://www.optiscan.com.au

Optomax
9 Ash Street
P.O. Box 840
Hollis, NH 03049
(603) 465-3385　FAX: (603) 465-2291

Opto-Line Associates
265 Ballardvale Street
Wilmington, MA 01887
(978) 658-7255　FAX: (978) 658-7299
http://www.optoline.com

Orbigen
6827 Nancy Ridge Drive
San Diego, CA 92121
(866) 672-4436 (858) 362-2030
(858) 362-2026
http://www.orbigen.com

Oread BioSaftey
1501 Wakarusa Drive
Lawrence, KS 66047
(800) 447-6501　FAX: (785) 749-1882
(785) 749-0034
http://www.oread.com

Organomation Associates
266 River Road West
Berlin, MA 01503
(888) 978-7300　FAX: (978)838-2786
(978) 838-7300
http://www.organomation.com

Organon
375 Mount Pleasant Avenue
West Orange, NJ 07052
(800) 241-8812　FAX: (973) 325-4589
(973) 325-4500
http://www.organon.com

Organon Teknika (Canada)
30 North Wind Place
Scarborough, Ontario
M1S 3R5 Canada
(416) 754-4344　FAX: (416) 754-4488
http://www.organonteknika.com

Organon Teknika Cappel
100 Akzo Avenue
Durham, NC 27712
(800) 682-2666　FAX: (800) 432-9682
(919) 620-2000　FAX: (919) 620-2107
http://www.organonteknika.com

Oriel Corporation of America
150 Long Beach Boulevard
Stratford, CT 06615
(203) 377-8282　FAX: (203) 378-2457
http://www.oriel.com

OriGene Technologies
6 Taft Court, Suite 300
Rockville, MD 20850
(888) 267-4436　FAX: (301) 340-9254
(301) 340-3188
http://www.origene.com

OriginLab
One Roundhouse Plaza
Northhampton, MA 01060
(800) 969-7720　FAX: (413) 585-0126
http://www.originlab.com

Orion Research
500 Cummings Center
Beverly, MA 01915
(800) 225-1480　FAX: (978) 232-6015
(978) 232-6000
http://www.orionres.com

Ortho Diagnostic Systems
Subsidiary of Johnson & Johnson
1001 U.S. Highway 202
P.O. Box 350
Raritan, NJ 08869
(800) 322-6374　FAX: (908) 218-8582
(908) 218-1300

Ortho McNeil Pharmaceutical
Welsh & McKean Road
Spring House, PA 19477
(800) 682-6532
(215) 628-5000
http://www.orthomcneil.com

Oryza
200 Turnpike Road, Unit 5
Chelmsford, MA 01824
(978) 256-8183　FAX: (978) 256-7434
http://www.oryzalabs.com

OSI Pharmaceuticals
106 Charles Lindbergh Boulevard
Uniondale, NY 11553
(800) 662-2616　FAX: (516) 222-0114
(516) 222-0023
http://www.osip.com

Osmonics
135 Flanders Road
P.O. Box 1046
Westborough, MA 01581
(800) 444-8212　FAX: (508) 366-5840
(508) 366-8212
http://www.osmolabstore.com

Oster Professional Products
150 Cadillac Lane
McMinnville, TN 37110
(931) 668-4121　FAX: (931) 668-4125
http://www.sunbeam.com

Out Patient Services
1260 Holm Road
Petaluma, CA 94954
(800) 648-1666 FAX: (707) 762-7198
(707) 763-1581

OWL Scientific Plastics
See OWL Separation Systems

OWL Separation Systems
55 Heritage Avenue
Portsmouth, NH 03801
(800) 242-5560 FAX: (603) 559-9258
(603) 559-9297
http://www.owlsci.com

Oxford Biochemical Research
P.O. Box 522
Oxford, MI 48371
(800) 692-4633 FAX: (248) 852-4466
http://www.oxfordbiomed.com

Oxford GlycoSystems
See Glyco

Oxford Instruments
Old Station Way
Eynsham
Witney, Oxfordshire OX8 1TL, UK
(44) 1865-881437
FAX: (44) 1865-881944
http://www.oxinst.com

Oxford Labware
See Kendall

Oxford Molecular Group
Oxford Science Park
The Medawar Centre
Oxford OX4 4GA, UK
(44) 1865-784600
FAX: (44) 1865-784601
http://www.oxmol.co.uk

Oxford Molecular Group
2105 South Bascom Avenue, Suite 200
Campbell, CA 95008
(800) 876-9994 FAX: (408) 879-6302
(408) 879-6300
http://www.oxmol.com

OXIS International
6040 North Cutter Circle
Suite 317
Portland, OR 97217
(800) 547-3686 FAX: (503) 283-4058
(503) 283-3911
http://www.oxis.com

Oxoid
800 Proctor Avenue
Ogdensburg, NY 13669
(800) 567-8378 FAX: (613) 226-3728
http://www.oxoid.ca

Oxoid
Wade Road
Basingstoke, Hampshire RG24 8PW, UK
(44) 1256-841144
FAX: (4) 1256-814626
http://www.oxoid.ca

Oxyrase
P.O. Box 1345
Mansfield, OH 44901
(419) 589-8800 FAX: (419) 589-9919
http://www.oxyrase.com

Ozyme
10 Avenue Ampere
Montigny de Bretoneux
78180 France
(33) 13-46-02-424
FAX: (33) 13-46-09-212
http://www.ozyme.fr

PAA Laboratories
2570 Route 724
P.O. Box 435
Parker Ford, PA 19457
(610) 495-9400 FAX: (610) 495-9410
http://www.paa-labs.com

Pacer Scientific
5649 Valley Oak Drive
Los Angeles, CA 90068
(323) 462-0636 FAX: (323) 462-1430
http://www.pacersci.com

Pacific Bio-Marine Labs
P.O. Box 1348
Venice, CA 90294
(310) 677-1056 FAX: (310) 677-1207

Packard Instrument
800 Research Parkway
Meriden, CT 06450
(800) 323-1891 FAX: (203) 639-2172
(203) 238-2351
http://www.packardinst.com

Padgett Instrument
1730 Walnut Street
Kansas City, MO 64108
(816) 842-1029

Pall Filtron
50 Bearfoot Road
Northborough, MA 01532
(800) FILTRON FAX: (508) 393-1874
(508) 393-1800

Pall-Gelman
25 Harbor Park Drive
Port Washington, NY 11050
(800) 289-6255 FAX: (516) 484-2651
(516) 484-3600
http://www.pall.com

PanVera
545 Science Drive
Madison, WI 53711
(800) 791-1400 FAX: (608) 233-3007
(608) 233-9450
http://www.panvera.com

Parke-Davis
See Warner-Lambert

Parr Instrument
211 53rd Street
Moline, IL 61265
(800) 872-7720 FAX: (309) 762-9453
(309) 762-7716
http://www.parrinst.com

Partec
Otto Hahn Strasse 32
D-48161 Munster, Germany
(49) 2534-8008-0
FAX: (49) 2535-8008-90

PCR
See Archimica Florida

PE Biosystems
850 Lincoln Centre Drive
Foster City, CA 94404
(800) 345-5224 FAX: (650) 638-5884
(650) 638-5800
http://www.pebio.com

Pel-Freez Biologicals
219 N. Arkansas
P.O. Box 68
Rogers, AR 72757
(800) 643-3426 FAX: (501) 636-3562
(501) 636-4361
http://www.pelfreez-bio.com

Pel-Freez Clinical Systems
Subsidiary of Pel-Freez Biologicals
9099 N. Deerbrook Trail
Brown Deer, WI 53223
(800) 558-4511 FAX: (414) 357-4518
(414) 357-4500
http://www.pelfreez-bio.com

Peninsula Laboratories
601 Taylor Way
San Carlos, CA 94070
(800) 650-4442 FAX: (650) 595-4071
(650) 592-5392
http://www.penlabs.com

Pentex
24562 Mando Drive
Laguna Niguel, CA 92677
(800) 382-4667 FAX: (714) 643-2363
http://www.pentex.com

PeproTech
5 Crescent Avenue
P.O. Box 275
Rocky Hill, NJ 08553
(800) 436-9910 FAX: (609) 497-0321
(609) 497-0253
http://www.peprotech.com

Peptide Institute
4-1-2 Ina, Minoh-shi
Osaka 562-8686, Japan
81-727-29-4121 FAX: 81-727-29-4124
http://www.peptide.co.jp

Peptide Laboratory
4175 Lakeside Drive
Richmond, CA 94806
(800) 858-7322 FAX: (510) 262-9127
(510) 262-0800
http://www.peptidelab.com

Peptides International
11621 Electron Drive
Louisville, KY 40299
(800) 777-4779 FAX: (502) 267-1329
(502) 266-8787
http://www.pepnet.com

Perceptive Science Instruments
2525 South Shore Boulevard, Suite 100
League City, TX 77573
(281) 334-3027 FAX: (281) 538-2222
http://www.persci.com

Perimed
4873 Princeton Drive
North Royalton, OH 44133
(440) 877-0537 FAX: (440) 877-0534
http://www.perimed.se

Perkin-Elmer
761 Main Avenue
Norwalk, CT 06859
(800) 762-4002 FAX: (203) 762-6000
(203) 762-1000
http://www.perkin-elmer.com
See also PE Biosystems

PerSeptive Bioresearch Products
See PerSeptive BioSystems

PerSeptive BioSystems
500 Old Connecticut Path
Framingham, MA 01701
(800) 899-5858 FAX: (508) 383-7885
(508) 383-7700
http://www.pbio.com

PerSeptive Diagnostic
See PE Biosystems
(800) 343-1346

Pettersson Elektronik AB
Tallbacksvagen 51
S-756 45 Uppsala, Sweden
(46) 1830-3880 FAX: (46) 1830-3840
http://www.bahnhof.se/~pettersson

Pfanstiehl Laboratories, Inc.
1219 Glen Rock Avenue
Waukegan, IL 60085
(800) 383-0126 FAX: (847) 623-9173
http://www.pfanstiehl.com

PGC Scientifics
7311 Governors Way
Frederick, MD 21704
(800) 424-3300 FAX: (800) 662-1112
(301) 620-7777 FAX: (301) 620-7497
http://www.pgcscientifics.com

Pharmacia Biotech
See Amersham Pharmacia Biotech

Pharmacia Diagnostics
See Wallac

Pharmacia LKB Biotech
See Amersham Pharmacia Biotech

Pharmacia LKB Biotechnology
See Amersham Pharmacia Biotech

Pharmacia LKB Nuclear
See Wallac

Pharmaderm Veterinary Products
60 Baylis Road
Melville, NY 11747
(800) 432-6673
http://www.pharmaderm.com

Pharmed (Norton)
Norton Performance Plastics
See Saint-Gobain Performance Plastics

PharMingen
See BD PharMingen

Phenomex
2320 W. 205th Street
Torrance, CA 90501
(310) 212-0555 FAX: (310) 328-7768
http://www.phenomex.com

PHLS Centre for Applied
Microbiology and Research
See European Collection of Animal
Cell Cultures (ECACC)

Phoenix Flow Systems
11575 Sorrento Valley Road, Suite 208
San Diego, CA 92121
(800) 886-3569 FAX: (619) 259-5268
(619) 453-5095
http://www.phnxflow.com

Phoenix Pharmaceutical
4261 Easton Road, P.O. Box 6457
St. Joseph, MO 64506
(800) 759-3644 FAX: (816) 364-4969
(816) 364-5777
http://www.phoenixpharmaceutical.com

Photometrics
See Roper Scientific

Photon Technology International
1 Deerpark Drive, Suite F
Monmouth Junction, NJ 08852
(732) 329-0910 FAX: (732) 329-9069
http://www.pti-nj.com

Physik Instrumente
Polytec PI
23 Midstate Drive, Suite 212
Auburn, MA 01501
(508) 832-3456 FAX: (508) 832-0506
http://www.polytecpi.com

Physitemp Instruments
154 Huron Avenue
Clifton, NJ 07013
(800) 452-8510 FAX: (973) 779-5954
(973) 779-5577
http://www.physitemp.com

Pico Technology
The Mill House, Cambridge Street
St. Neots, Cambridgeshire
PE19 1QB, UK
(44) 1480-396-395
FAX: (44) 1480-396-296
http://www.picotech.com

Pierce Chemical
P.O. Box 117
3747 Meridian Road
Rockford, IL 61105
(800) 874-3723 FAX: (800) 842-5007
FAX: (815) 968-7316
http://www.piercenet.com

Pierce & Warriner
44, Upper Northgate Street
Chester, Cheshire CH1 4EF, UK
(44) 1244 382 525
FAX: (44) 1244 373 212
http://www.piercenet.com

Pilling Weck Surgical
420 Delaware Drive
Fort Washington, PA 19034
(800) 523-2579 FAX: (800) 332-2308
http://www.pilling-weck.com

PixelVision
A division of Cybex Computer Products
14964 NW Greenbrier Parkway
Beaverton, OR 97006
(503) 629-3210 FAX: (503) 629-3211
http://www.pixelvision.com

P.J. Noyes
P.O. Box 381
89 Bridge Street
Lancaster, NH 03584
(800) 522-2469 FAX: (603) 788-3873
(603) 788-4952
http://www.pjnoyes.com

Plas-Labs
917 E. Chilson Street
Lansing, MI 48906
(800) 866-7527 FAX: (517) 372-2857
(517) 372-7177
http://www.plas-labs.com

Plastics One
6591 Merriman Road, Southwest
P.O. Box 12004
Roanoke, VA 24018
(540) 772-7950 FAX: (540) 989-7519
http://www.plastics1.com

Platt Electric Supply
2757 6th Avenue South
Seattle, WA 98134
(206) 624-4083 FAX: (206) 343-6342
http://www.platt.com

Plexon
6500 Greenville Avenue
Suite 730
Dallas,TX 75206
(214) 369-4957 FAX: (214) 369-1775
http://www.plexoninc.com

Polaroid
784 Memorial Drive
Cambridge, MA 01239
(800) 225-1618 FAX: (800) 832-9003
(781) 386-2000
http://www.polaroid.com

Polyfiltronics
136 Weymouth St.
Rockland, MA 02370
(800) 434-7659 FAX: (781) 878-0822
(781) 878-1133
http://www.polyfiltronics.com

Polylabo Paul Block
Parc Tertiare de la Meinau
10, rue de la Durance
B.P. 36
67023 Strasbourg Cedex 1
Strasbourg, France
33-3-8865-8020
FAX: 33-3-8865-8039

PolyLC
9151 Rumsey Road, Suite 180
Columbia, MD 21045
(410) 992-5400 FAX: (410) 730-8340

Polymer Laboratories
Amherst Research Park
160 Old Farm Road
Amherst, MA 01002
(800) 767-3963 FAX: (413) 253-2476
http://www.polymerlabs.com

Polymicro Technologies
18019 North 25th Avenue
Phoenix, AZ 85023
(602) 375-4100 FAX: (602) 375-4110
http://www.polymicro.com

Polyphenols AS
Hanabryggene Technology Centre
Hanaveien 4-6
4327 Sandnes, Norway
(47) 51-62-0990
FAX: (47) 51-62-51-82
http://www.polyphenols.com

Polysciences
400 Valley Road
Warrington, PA 18976
(800) 523-2575 FAX: (800) 343-3291
http://www.polysciences.com

Polyscientific
70 Cleveland Avenue
Bayshore, NY 11706
(516) 586-0400 FAX: (516) 254-0618

Polytech Products
285 Washington Street
Somerville, MA 02143
(617) 666-5064 FAX: (617) 625-0975

Polytron
8585 Grovemont Circle
Gaithersburg, MD 20877
(301) 208-6597 FAX: (301) 208-8691
http://www.polytron.com

Popper and Sons
300 Denton Avenue
P.O. Box 128
New Hyde Park, NY 11040
(888) 717-7677 FAX: (800) 557-6773
(516) 248-0300 FAX: (516) 747-1188
http://www.popperandsons.com

Porphyrin Products
P.O. Box 31
Logan, UT 84323
(435) 753-1901 FAX: (435) 753-6731
http://www.porphyrin.com

Portex
See SIMS Portex Limited

Powderject Vaccines
585 Science Drive
Madison, WI 53711
(608) 231-3150 FAX: (608) 231-6990
http://www.powderject.com

Praxair
810 Jorie Boulevard
Oak Brook, IL 60521
(800) 621-7100
http://www.praxair.com

Precision Dynamics
13880 Del Sur Street
San Fernando, CA 91340
(800) 847-0670 FAX: (818) 899-4-45
http://www.pdcorp.com

Precision Scientific Laboratory
Equipment
Division of Jouan
170 Marcel Drive
Winchester, VA 22602
(800) 621-8820 FAX: (540) 869-0130
(540) 869-9892
http://www.precisionsci.com

Primary Care Diagnostics
See Becton Dickinson Primary
Care Diagnostics

Primate Products
1755 East Bayshore Road, Suite 28A
Redwood City, CA 94063
(650) 368-0663 FAX: (650) 368-0665
http://www.primateproducts.com

5 Prime → 3 Prime
See 2000 Eppendorf-5 Prime
http://www.5prime.com

Princeton Applied Research
PerkinElmer Instr.: Electrochemistry
801 S. Illinois
Oak Ridge, TN 37830
(800) 366-2741 FAX: (423) 425-1334
(423) 481-2442
http://www.eggpar.com

Princeton Instruments
A division of Roper Scientific
3660 Quakerbridge Road
Trenton, NJ 08619
(609) 587-9797 FAX: (609) 587-1970
http://www.prinst.com

Princeton Separations
P.O. Box 300
Aldephia, NJ 07710
(800) 223-0902 FAX: (732) 431-3768
(732) 431-3338

Prior Scientific
80 Reservoir Park Drive
Rockland, MA 02370
(781) 878-8442 FAX: (781) 878-8736
http://www.prior.com

PRO Scientific
P.O. Box 448
Monroe, CT 06468
(203) 452-9431 FAX: (203) 452-9753
http://www.proscientific.com

Professional Compounding Centers of America
9901 South Wilcrest Drive
Houston, TX 77099
(800) 331-2498 FAX: (281) 933-6227
(281) 933-6948
http://www.pccarx.com

Progen Biotechnik
Maass-Str. 30
69123 Heidelberg, Germany
(49) 6221-8278-0
FAX: (49) 6221-8278-23
http://www.progen.de

Prolabo
A division of Merck Eurolab
54 rue Roger Salengro
94126 Fontenay Sous Bois Cedex
France
33-1-4514-8500
FAX: 33-1-4514-8616
http://www.prolabo.fr

Proligo
2995 Wilderness Place
Boulder, CO 80301
(888) 80-OLIGO FAX: (303) 801-1134
http://www.proligo.com

Promega
2800 Woods Hollow Road
Madison, WI 53711
(800) 356-9526 FAX: (800) 356-1970
(608) 274-4330 FAX: (608) 277-2516
http://www.promega.com

Protein Databases (PDI)
405 Oakwood Road
Huntington Station, NY 11746
(800) 777-6834 FAX: (516) 673-4502
(516) 673-3939

Protein Polymer Technologies
10655 Sorrento Valley Road
San Diego, CA 92121
(619) 558-6064 FAX: (619) 558-6477
http://www.ppti.com

Protein Solutions
391 G Chipeta Way
Salt Lake City, UT 84108
(801) 583-9301 FAX: (801) 583-4463
http://www.proteinsolutions.com

Prozyme
1933 Davis Street, Suite 207
San Leandro, CA 94577
(800) 457-9444 FAX: (510) 638-6919
(510) 638-6900
http://www.prozyme.com

PSI
See Perceptive Science Instruments

Pulmetrics Group
82 Beacon Street
Chestnut Hill, MA 02167
(617) 353-3833 FAX: (617) 353-6766

Purdue Frederick
100 Connecticut Avenue
Norwalk, CT 06850
(800) 633-4741 FAX: (203) 838-1576
(203) 853-0123
http://www.pharma.com

Purina Mills
LabDiet
P. O. Box 66812
St. Louis, MO 63166
(800) 227-8941 FAX: (314) 768-4894
http://www.purina-mills.com

Qbiogene
2251 Rutherford Road
Carlsbad, CA 92008
(800) 424-6101 FAX: (760) 918-9313
http://www.qbiogene.com

Qiagen
28159 Avenue Stanford
Valencia, CA 91355
(800) 426-8157 FAX: (800) 718-2056
http://www.qiagen.com

Quality Biological
7581 Lindbergh Drive
Gaithersburg, MD 20879
(800) 443-9331 FAX: (301) 840-5450
(301) 840-9331
http://www.qualitybiological.com

Quantitative Technologies
P.O. Box 470
Salem Industrial Park, Bldg. 5
Whitehouse, NJ 08888
(908) 534-4445 FAX: 534-1054
http://www.qtionline.com

Quantum Appligene
Parc d'Innovation
Rue Geller de Kayserberg
67402 Illkirch, Cedex, France
(33) 3-8867-5425
FAX: (33) 3-8867-1945
http://www.quantum-appligene.com

Quantum Biotechnologies
See Qbiogene

Quantum Soft
Postfach 6613
CH-8023
Zurich, Switzerland
FAX: 41-1-481-69-51
profit@quansoft.com

Questcor Pharmaceuticals
26118 Research Road
Hayward, CA 94545
(510) 732-5551 FAX: (510) 732-7741
http://www.questcor.com

Quidel
10165 McKellar Court
San Diego, CA 92121
(800) 874-1517 FAX: (858) 546-8955
(858) 552-1100
http://www.quidel.com

R-Biopharm
7950 Old US 27 South
Marshall, MI 49068
(616) 789-3033 FAX: (616) 789-3070
http://www.r-biopharm.com

R. C. Electronics
6464 Hollister Avenue
Santa Barbara, CA 93117
(805) 685-7770 FAX: (805) 685-5853
http://www.rcelectronics.com

R & D Systems
614 McKinley Place NE
Minneapolis, MN 55413
(800) 343-7475 FAX: (612) 379-6580
(612) 379-2956
http://www.rndsystems.com

R & S Technology
350 Columbia Street
Peacedale, RI 02880
(401) 789-5660 FAX: (401) 792-3890
http://www.septech.com

RACAL Health and Safety
See 3M
7305 Executive Way
Frederick, MD 21704
(800) 692-9500 FAX: (301) 695-8200

Radiometer America
811 Sharon Drive
Westlake, OH 44145
(800) 736-0600 FAX: (440) 871-2633
(440) 871-8900
http://www.rameusa.com

Radiometer A/S
The Chemical Reference Laboratory
kandevej 21
DK-2700 Brnshj, Denmark
45-3827-3827 FAX: 45-3827-2727

Radionics
22 Terry Avenue
Burlington, MA 01803
(781) 272-1233 FAX: (781) 272-2428
http://www.radionics.com

Radnoti Glass Technology
227 W. Maple Avenue
Monrovia, CA 91016
(800) 428-l4l6 FAX: (626) 303-2998
(626) 357-8827
http://www.radnoti.com

Rainin Instrument
Rainin Road
P.O. Box 4026
Woburn, MA 01888
(800)-4-RAININ FAX: (781) 938-1152
(781) 935-3050
http://www.rainin.com

Rank Brothers
56 High Street
Bottisham, Cambridge
CB5 9DA UK
(44) 1223 811369
FAX: (44) 1223 811441
http://www.rankbrothers.com

Rapp Polymere
Ernst-Simon Strasse 9
D 72072 Tubingen, Germany
(49) 7071-763157
FAX: (49) 7071-763158
http://www.rapp-polymere.com

Raven Biological Laboratories
8607 Park Drive
P.O. Box 27261
Omaha, NE 68127
(800) 728-5702 FAX: (402) 593-0995
(402) 593-0781
http://www.ravenlabs.com

Razel Scientific Instruments
100 Research Drive
Stamford, CT 06906
(203) 324-9914 FAX: (203) 324-5568

RBI
See Research Biochemicals

Reagents International
See Biotech Source

Receptor Biology
10000 Virginia Manor Road, Suite 360
Beltsville, MD 20705
(888) 707-4200 FAX: (301) 210-6266
(301) 210-4700
http://www.receptorbiology.com

Regis Technologies
8210 N. Austin Avenue
Morton Grove, IL 60053
(800) 323-8144 FAX: (847) 967-1214
(847) 967-6000
http://www.registech.com

Reichert Ophthalmic Instruments
P.O. Box 123
Buffalo, NY 14240
(716) 686-4500 FAX: (716) 686-4545
http://www.reichert.com

Reiss
1 Polymer Place
P.O. Box 60
Blackstone, VA 23824
(800) 356-2829 FAX: (804) 292-1757
(804) 292-1600
http://www.reissmfg.com

Remel
12076 Santa Fe Trail Drive
P.O. Box 14428
Shawnee Mission, KS 66215
(800) 255-6730 FAX: (800) 621-8251
(913) 888-0939 FAX: (913) 888-5884
http://www.remelinc.com

Reming Bioinstruments
6680 County Route 17
Redfield, NY 13437
(315) 387-3414 FAX: (315) 387-3415

RepliGen
117 Fourth Avenue
Needham, MA 02494
(800) 622-2259 FAX: (781) 453-0048
(781) 449-9560
http://www.repligen.com

Research Biochemicals
1 Strathmore Road
Natick, MA 01760
(800) 736-3690 FAX: (800) 736-2480
(508) 651-8151 FAX: (508) 655-1359
http://www.resbio.com

Research Corporation Technologies
101 N. Wilmot Road, Suite 600
Tucson, AZ 85711
(520) 748-4400 FAX: (520) 748-0025
http://www.rctech.com

Research Diagnostics
Pleasant Hill Road
Flanders, NJ 07836
(800) 631-9384 FAX: (973) 584-0210
(973) 584-7093
http://www.researchd.com

Research Diets
121 Jersey Avenue
New Brunswick, NJ 08901
(877) 486-2486 FAX: (732) 247-2340
(732) 247-2390
http://www.researchdiets.com

Research Genetics
2130 South Memorial Parkway
Huntsville, AL 35801
(800) 533-4363 FAX: (256) 536-9016
(256) 533-4363
http://www.resgen.com

Research Instruments
Kernick Road Pernryn
Cornwall TR10 9DQ, UK
(44) 1326-372-753
FAX: (44) 1326-378-783
http://www.research-instruments.com

Research Organics
4353 E. 49th Street
Cleveland, OH 44125
(800) 321-0570 FAX: (216) 883-1576
(216) 883-8025
http://www.resorg.com

Research Plus
P.O. Box 324
Bayonne, NJ 07002
(800) 341-2296 FAX: (201) 823-9590
(201) 823-3592
http://www.researchplus.com

Research Products International
410 N. Business Center Drive
Mount Prospect, IL 60056
(800) 323-9814 FAX: (847) 635-1177
(847) 635-7330
http://www.rpicorp.com

Research Triangle Institute
P.O. Box 12194
Research Triangle Park, NC 27709
(919) 541-6000 FAX: (919) 541-6515
http://www.rti.org

Restek
110 Benner Circle
Bellefonte, PA 16823
(800) 356-1688 FAX: (814) 353-1309
(814) 353-1300
http://www.restekcorp.com

Rheodyne
P.O. Box 1909
Rohnert Park, CA 94927
(707) 588-2000 FAX: (707) 588-2020
http://www.rheodyne.com

Rhone Merieux
See Merial Limited

Rhone-Poulenc
2 T W Alexander Drive
P.O. Box 12014
Research Triangle Park, NC 08512
(919) 549-2000 FAX: (919) 549-2839
http://www.Rhone-Poulenc.com
Also see Aventis

Rhone-Poulenc Rorer
500 Arcola Road
Collegeville, PA 19426
(800) 727-6737 FAX: (610) 454-8940
(610) 454-8975
http://www.rp-rorer.com

Rhone-Poulenc Rorer
Centre de Recherche de Vitry-Alfortville
13 Quai Jules Guesde, BP14 94403
Vitry Sur Seine, Cedex, France
(33) 145-73-85-11
FAX: (33) 145-73-81-29
http://www.rp-rorer.com

Ribi ImmunoChem Research
563 Old Corvallis Road
Hamilton, MT 59840
(800) 548-7424 FAX: (406) 363-6129
(406) 363-3131
http://www.ribi.com

RiboGene
See Questcor Pharmaceuticals

Ricca Chemical
448 West Fork Drive
Arlington, TX 76012
(888) GO-RICCA FAX: (800) RICCA-93
(817) 461-5601
http://www.riccachemical.com

Richard-Allan Scientific
225 Parsons Street
Kalamazoo, MI 49007
(800) 522-7270 FAX: (616) 345-3577
(616) 344-2400
http://www.rallansci.com

Richelieu Biotechnologies
11 177 Hamon
Montral, Quebec
H3M 3E4 Canada
(802) 863-2567 FAX: (802) 862-2909
http://www.richelieubio.com

Richter Enterprises
20 Lake Shore Drive
Wayland, MA 01778
(508) 655-7632 FAX: (508) 652-7264
http://www.richter-enterprises.com

Riese Enterprises
BioSure Division
12301 G Loma Rica Drive
Grass Valley, CA 95945
(800) 345-2267 FAX: (916) 273-5097
(916) 273-5095
http://www.biosure.com

Robbins Scientific
1250 Elko Drive
Sunnyvale, CA 94086
(800) 752-8585 FAX: (408) 734-0300
(408) 734-8500
http://www.robsci.com

Roboz Surgical Instruments
9210 Corporate Boulevard, Suite 220
Rockville, MD 20850
(800) 424-2984 FAX: (301) 590-1290
(301) 590-0055

Roche Diagnostics
9115 Hague Road
P.O. Box 50457
Indianapolis, IN 46256
(800) 262-1640 FAX: (317) 845-7120
(317) 845-2000
http://www.roche.com

Roche Molecular Systems
See Roche Diagnostics

Rocklabs
P.O. Box 18-142
Auckland 6, New Zealand
(64) 9-634-7696
FAX: (64) 9-634-7696
http://www.rocklabs.com

Rockland
P.O. Box 316
Gilbertsville, PA 19525
(800) 656-ROCK FAX: (610) 367-7825
(610) 369-1008
http://www.rockland-inc.com

Rohm
Chemische Fabrik
Kirschenallee
D-64293 Darmstadt, Germany
(49) 6151-1801 FAX: (49) 6151-1802
http://www.roehm.com

Roper Scientific
3440 East Brittania Drive, Suite 100
Tucson, AZ 85706
(520) 889-9933 FAX: (520) 573-1944
http://www.roperscientific.com

Rosetta Inpharmatics
12040 115th Avenue NE
Kirkland, WA 98034
(425) 820-8900 FAX: (425) 820-5757
http://www.rii.com

ROTH-SOCHIEL
3 rue de la Chapelle
Lauterbourg
67630 France
(33) 03-88-94-82-42
FAX: (33) 03-88-54-63-93

Rotronic Instrument
160 E. Main Street
Huntington, NY 11743
(631) 427-3898 FAX: (631) 427-3902
http://www.rotronic-usa.com

Roundy's
23000 Roundy Drive
Pewaukee, WI 53072
(262) 953-7999 FAX: (262) 953-7989
http://www.roundys.com

RS Components
Birchington Road
Weldon Industrial Estate
Corby, Northants NN17 9RS, UK
(44) 1536 201234
FAX: (44) 1536 405678
http://www.rs-components.com

Rubbermaid
See Newell Rubbermaid

SA Instrumentation
1437 Tzena Way
Encinitas, CA 92024
(858) 453-1776 FAX: (800) 266-1776
http://www.sainst.com

Safe Cells
See Bionique Testing Labs

Sage Instruments
240 Airport Boulevard
Freedom, CA 95076
831-761-1000 FAX: 831-761-1008
http://www.sageinst.com

Sage Laboratories
11 Huron Drive
Natick, MA 01760
(508) 653-0844 FAX: 508-653-5671
http://www.sagelabs.com

Saint-Gobain Performance Plastics
P.O. Box 3660
Akron, OH 44309
(330) 798-9240 FAX: (330) 798-6968
http://www.nortonplastics.com

San Diego Instruments
7758 Arjons Drive
San Diego, CA 92126
(858) 530-2600 FAX: (858) 530-2646
http://www.sd-inst.com

Sandown Scientific
Beards Lodge
25 Oldfield Road
Hampden, Middlesex TW12 2AJ, UK
(44) 2089 793300
FAX: (44) 2089 793311
http://www.sandownsci.com

Sandoz Pharmaceuticals
See Novartis

Sanofi Recherche
Centre de Montpellier
371 Rue du Professor Blayac
34184 Montpellier, Cedex 04
France
(33) 67-10-67-10
FAX: (33) 67-10-67-67

Sanofi Winthrop Pharmaceuticals
90 Park Avenue
New York, NY 10016
(800) 223-5511 FAX: (800) 933-3243
(212) 551-4000
http://www.sanofi-synthelabo.com/us

Santa Cruz Biotechnology
2161 Delaware Avenue
Santa Cruz, CA 95060
(800) 457-3801 FAX: (831) 457-3801
(831) 457-3800
http://www.scbt.com

Sarasep
(800) 605-0267 FAX: (408) 432-3231
(408) 432-3230
http://www.transgenomic.com

Sarstedt
P.O. Box 468
Newton, NC 28658
(800) 257-5101 FAX: (828) 465-4003
(828) 465-4000
http://www.sarstedt.com

Sartorius
131 Heartsland Boulevard
Edgewood, NY 11717
(800) 368-7178 FAX: (516) 254-4253
http://www.sartorius.com

SAS Institute
Pacific Telesis Center
One Montgomery Street
San Francisco, CA 94104
(415) 421-2227 FAX: (415) 421-1213
http://www.sas.com

Savant/EC Apparatus
A ThermoQuest company
100 Colin Drive
Holbrook, NY 11741
(800) 634-8886 FAX: (516) 244-0606
(516) 244-2929
http://www.savec.com

Savillex
6133 Baker Road
Minnetonka, MN 55345
(612) 935-5427

Scanalytics
Division of CSP
8550 Lee Highway, Suite 400
Fairfax, VA 22031
(800) 325-3110 FAX: (703) 208-1960
(703) 208-2230
http://www.scanalytics.com

Schering Laboratories
See Schering-Plough

Schering-Plough
1 Giralda Farms
Madison, NJ 07940
(800) 222-7579 FAX: (973) 822-7048
(973) 822-7000
http://www.schering-plough.com

Schleicher & Schuell
10 Optical Avenue
Keene, NH 03431
(800) 245-4024 FAX: (603) 357-3627
(603) 352-3810
http://www.s-und-s.de/english-index.html

Science Technology Centre
1250 Herzberg Laboratories
Carleton University
1125 Colonel Bay Drive
Ottawa, Ontario
K1S 5B6 Canada
(613) 520-4442 FAX: (613) 520-4445
http://www.carleton.ca/universities/stc

Scientific Instruments
200 Saw Mill River Road
Hawthorne, NY 10532
(800) 431-1956 FAX: (914) 769-5473
(914) 769-5700
http://www.scientificinstruments.com

Scientific Solutions
9323 Hamilton
Mentor, OH 44060
(440) 357-1400 FAX: (440) 357-1416
http://www.labmaster.com

Scion
82 Worman's Mill Court, Suite H
Frederick, MD 21701
(301) 695-7870 FAX: (301) 695-0035
http://www.scioncorp.com

Scott Specialty Gases
6141 Easton Road
P.O. Box 310
Plumsteadville, PA 18949
(800) 21-SCOTT FAX: (215) 766-2476
(215) 766-8861
http://www.scottgas.com

Scripps Clinic and Research Foundation
Instrumentation and Design Lab
10666 N. Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037
(800) 992-9962 FAX: (858) 554-8986
(858) 455-9100
http://www.scrippsclinic.com

SDI Sensor Devices
407 Pilot Court, 400A
Waukesha, WI 53188
(414) 524-1000 FAX: (414) 524-1009

Sefar America
111 Calumet Street
Depew, NY 14043
(716) 683-4050 FAX: (716) 683-4053
http://www.sefaramerica.com

Seikagaku America
Division of Associates of Cape Cod
704 Main Street
Falmouth, MA 02540
(800) 237-4512 FAX: (508) 540-8680
(508) 540-3444
http://www.seikagaku.com

Sellas Medizinische Gerate
Hagener Str. 393
Gevelsberg-Vogelsang, 58285
Germany
(49) 23-326-1225

Sensor Medics
22705 Savi Ranch Parkway
Yorba Linda, CA 92887
(800) 231-2466 FAX: (714) 283-8439
(714) 283-2228
http://www.sensormedics.com

Sensor Systems LLC
2800 Anvil Street, North
Saint Petersburg, FL 33710
(800) 688-2181 FAX: (727) 347-3881
(727) 347-2181
http://www.vsensors.com

SenSym/Foxboro ICT
1804 McCarthy Boulevard
Milpitas, CA 95035
(800) 392-9934 FAX: (408) 954-9458
(408) 954-6700
http://www.sensym.com

Separations Group
See Vydac

Sepracor
111 Locke Drive
Marlboro, MA 01752
(877)-SEPRACOR (508) 357-7300
http://www.sepracor.com

Sera-Lab
See Harlan Sera-Lab

Sermeter
925 Seton Court, #7
Wheeling, IL 60090
(847) 537-4747

Serological
195 W. Birch Street
Kankakee, IL 60901
(800) 227-9412 FAX: (815) 937-8285
(815) 937-8270

Seromed Biochrom
Leonorenstrasse 2-6
D-12247 Berlin, Germany
(49) 030-779-9060

Serotec
22 Bankside
Station Approach
Kidlington, Oxford OX5 1JE, UK
(44) 1865-852722
FAX: (44) 1865-373899
In the US: (800) 265-7376
http://www.serotec.co.uk

Serva Biochemicals
Distributed by Crescent Chemical

S.F. Medical Pharmlast
See Chase-Walton Elastomers

SGE
2007 Kramer Lane
Austin, TX 78758
(800) 945-6154 FAX: (512) 836-9159
(512) 837-7190
http://www.sge.com

Shandon/Lipshaw
171 Industry Drive
Pittsburgh, PA 15275
(800) 245-6212 FAX: (412) 788-1138
(412) 788-1133
http://www.shandon.com

Sharpoint
P.O. Box 2212
Taichung, Taiwan
Republic of China
(886) 4-3206320
FAX: (886) 4-3289879
http://www.sharpoint.com.tw

Shelton Scientific
230 Longhill Crossroads
Shelton, CT 06484
(800) 222-2092 FAX: (203) 929-2175
(203) 929-8999
http://www.sheltonscientific.com

Sherwood-Davis & Geck
See Kendall

Sherwood Medical
See Kendall

Shimadzu Scientific Instruments
7102 Riverwood Drive
Columbia, MD 21046
(800) 477-1227 FAX: (410) 381-1222
(410) 381-1227
http://www.ssi.shimadzu.com

Sialomed
See Amika

Siemens Analytical X-Ray Systems
See Bruker Analytical X-Ray Systems

Sievers Instruments
Subsidiary of Ionics
6060 Spine Road
Boulder, CO 80301
(800) 255-6964 FAX: (303) 444-6272
(303) 444-2009
http://www.sieversinst.com

SIFCO
970 East 46th Street
Cleveland, OH 44103
(216) 881-8600 FAX: (216) 432-6281
http://www.sifco.com

Sigma-Aldrich
3050 Spruce Street
St. Louis, MO 63103
(800) 358-5287 FAX: (800) 962-9591
(800) 325-3101 FAX: (800) 325-5052
http://www.sigma-aldrich.com

Sigma-Aldrich Canada
2149 Winston Park Drive
Oakville, Ontario
L6H 6J8 Canada
(800) 5652D1400 FAX: (800) 2652D3858
http://www.sigma-aldrich.com

Silenus/Amrad
34 Wadhurst Drive
Boronia, Victoria 3155 Australia
(613)9887-3909 FAX: (613)9887-3912
http://www.amrad.com.au

Silicon Genetics
2601 Spring Street
Redwood City, CA 94063
(866) SIG SOFT FAX: (650) 365 1735
(650) 367 9600
http://www.sigenetics.com

SIMS Deltec
1265 Grey Fox Road
St. Paul, Minnesota 55112
(800) 426-2448 FAX: (615) 628-7459
http://www.deltec.com

SIMS Portex
10 Bowman Drive
Keene, NH 03431
(800) 258-5361 FAX: (603) 352-3703
(603) 352-3812
http://www.simsmed.com

SIMS Portex Limited
Hythe, Kent CT21 6JL, UK
(44)1303-260551
FAX: (44)1303-266761
http://www.portex.com

Siris Laboratories
See Biosearch Technologies

Skatron Instruments
See Molecular Devices

SLM Instruments
See Spectronic Instruments

SLM-AMINCO Instruments
See Spectronic Instruments

Small Parts
13980 NW 58th Court
P.O. Box 4650
Miami Lakes, FL 33014
(800) 220-4242 FAX: (800) 423-9009
(305) 558-1038 FAX: (305) 558-0509
http://www.smallparts.com

Smith & Nephew
11775 Starkey Road
P.O. Box 1970
Largo, FL 33779
(800) 876-1261
http://www.smith-nephew.com

SmithKline Beecham
1 Franklin Plaza, #1800
Philadelphia, PA 19102
(215) 751-4000 FAX: (215) 751-4992
http://www.sb.com

Solid Phase Sciences
See Biosearch Technologies

SOMA Scientific Instruments
5319 University Drive, PMB #366
Irvine, CA 92612
(949) 854-0220 FAX: (949) 854-0223
http://somascientific.com

Somatix Therapy
See Cell Genesys

Sonics & Materials
53 Church Hill Road
Newtown, CT 06470
(800) 745-1105 FAX: (203) 270-4610
(203) 270-4600
http://www.sonicsandmaterials.com

Sonosep Biotech
See Triton Environmental Consultants

Sorvall
See Kendro Laboratory Products

Southern Biotechnology Associates
P.O. Box 26221
Birmingham, AL 35260
(800) 722-2255 FAX: (205) 945-8768
(205) 945-1774
http://SouthernBiotech.com

SPAFAS
190 Route 165
Preston, CT 06365
(800) SPAFAS-1 FAX: (860) 889-1991
(860) 889-1389
http://www.spafas.com

Specialty Media
Division of Cell & Molecular Technologies
580 Marshall Street
Phillipsburg, NJ 08865
(800) 543-6029 FAX: (908) 387-1670
(908) 454-7774
http://www.specialtymedia.com

Spectra Physics
See Thermo Separation Products

Spectramed
See BOC Edwards

SpectraSource Instruments
31324 Via Colinas, Suite 114
Westlake Village, CA 91362
(818) 707-2655 FAX: (818) 707-9035
http://www.spectrasource.com

Spectronic Instruments
820 Linden Avenue
Rochester, NY 14625
(800) 654-9955 FAX: (716) 248-4014
(716) 248-4000
http://www.spectronic.com

Spectrum Medical Industries
See Spectrum Laboratories

Spectrum Laboratories
18617 Broadwick Street
Rancho Dominguez, CA 90220
(800) 634-3300 FAX: (800) 445-7330
(310) 885-4601 FAX: (310) 885-4666
http://www.spectrumlabs.com

Spherotech
1840 Industrial Drive, Suite 270
Libertyville, IL 60048
(800) 368-0822 FAX: (847) 680-8927
(847) 680-8922
http://www.spherotech.com

SPSS
233 S. Wacker Drive, 11th floor
Chicago, IL 60606
(800) 521-1337 FAX: (800) 841-0064
http://www.spss.com

SS White Burs
1145 Towbin Avenue
Lakewood, NJ 08701
(732) 905-1100 FAX: (732) 905-0987
http://www.sswhiteburs.com

Stag Instruments
16 Monument Industrial Park
Chalgrove, Oxon OX44 7RW, UK
(44) 1865-891116
FAX: (44) 1865-890562

Standard Reference Materials Program
National Institute of Standards and Technology
Building 202, Room 204
Gaithersburg, MD 20899
(301) 975-6776 FAX: (301) 948-3730

Starna Cells
P.O. Box 1919
Atascandero, CA 93423
(805) 466-8855 FAX: (805) 461-1575
(800) 228-4482
http://www.starnacells.com

Starplex Scientific
50 Steinway
Etobieoke, Ontario
M9W 6Y3 Canada
(800) 665-0954 FAX: (416) 674-6067
(416) 674-7474
http://www.starplexscientific.com

State Laboratory Institute of Massachusetts
305 South Street
Jamaica Plain, MA 02130
(617) 522-3700 FAX: (617) 522-8735
http://www.state.ma.us/dph

Stedim Labs
1910 Mark Court, Suite 110
Concord, CA 94520
(800) 914-6644 FAX: (925) 689-6988
(925) 689-6650
http://www.stedim.com

Steinel America
9051 Lyndale Avenue
Bloomington, MN 55420
(800) 852 4343 FAX: (952) 888-5132
http://www.steinelamerica.com

Stem Cell Technologies
777 West Broadway, Suite 808
Vancouver, British Columbia
V5Z 4J7 Canada
(800) 667-0322 FAX: (800) 567-2899
(604) 877-0713 FAX: (604) 877-0704
http://www.stemcell.com

Stephens Scientific
107 Riverdale Road
Riverdale, NJ 07457
(800) 831-8099 FAX: (201) 831-8009
(201) 831-9800

Steraloids
P.O. Box 689
Newport, RI 02840
(401) 848-5422 FAX: (401) 848-5638
http://www.steraloids.com

Steris Corporation
5960 Heisley Road
Mentor, Ohio 44060
(800) 548-4873
440-354-2600
http://www.steris.com

Sterling Medical
2091 Springdale Road, Ste. 2
Cherry Hill, NJ 08003
(800) 229-0900 FAX: (800) 229-7854
http://www.sterlingmedical.com

Sterling Winthrop
90 Park Avenue
New York, NY 10016
(212) 907-2000 FAX: (212) 907-3626

Sternberger Monoclonals
10 Burwood Court
Lutherville, MD 21093
(410) 821-8505 FAX: (410) 821-8506
http://www.sternbergermonoclonals.com

Stoelting
502 Highway 67
Kiel, WI 53042
(920) 894-2293 FAX: (920) 894-7029
http://www.stoelting.com

Stovall Lifescience
206-G South Westgate Drive
Greensboro, NC 27407
(800) 852-0102 FAX: (336) 852-3507
http://www.slscience.com

Stratagene
11011 N. Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037
(800) 424-5444 FAX: (888) 267-4010
(858) 535-5400
http://www.stratagene.com

Strategic Applications
530A N. Milwaukee Avenue
Libertyville, IL 60048
(847) 680-9385 FAX: (847) 680-9837

Strem Chemicals
7 Mulliken Way
Newburyport, MA 01950
(800) 647-8736 FAX: (800) 517-8736
(978) 462-3191 FAX: (978) 465-3104
http://www.strem.com

StressGen Biotechnologies Biochemicals Division
120-4243 Glanford Avenue
Victoria, British Columbia
V8Z 4B9 Canada
(800) 661-4978 FAX: (250) 744-2877
(250) 744-2811
http://www.stressgen.com

Structure Probe/SPI Supplies (Epon-Araldite)
P.O. Box 656
West Chester, PA 19381
(800) 242-4774 FAX: (610) 436-5755
http://www.2spi.com

Sud-Chemie Performance Packaging
101 Christine Drive
Belen, NM 87002
(800) 989-3374 FAX: (505) 864-9296
http://www.uniteddesiccants.com

Sumitomo Chemical
Sumitomo Building
5-33, Kitahama 4-chome
Chuo-ku, Osaka 541-8550, Japan
(81) 6-6220-3891
FAX: (81)-6-6220-3345
http://www.sumitomo-chem.co.jp

Sun Box
19217 Orbit Drive
Gaithersburg, MD 20879
(800) 548-3968 FAX: (301) 977-2281
(301) 869-5980
http://www.sunboxco.com

Sunbrokers
See Sun International

Sun International
3700 Highway 421 North
Wilmington, NC 28401
(800) LAB-VIAL FAX: (800) 231-7861
http://www.autosamplervial.com

Sunox
1111 Franklin Boulevard, Unit 6
Cambridge, Ontario
N1R 8B5 Canada
(519) 624-4413 FAX: (519) 624-8378
http://www.sunox.ca

Supelco
See Sigma-Aldrich

SuperArray
P.O. Box 34494
Bethesda, MD 20827
(888) 503-3187 FAX: (301) 765-9859
(301) 765-9888
http://www.superarray.com

Surface Measurement Systems
3 Warple Mews, Warple Way
London W3 ORF, UK
(44) 20-8749-4900
FAX: (44) 20-8749-6749
http://www.smsuk.co.uk/index.htm

SurgiVet
N7 W22025 Johnson Road, Suite A
Waukesha, WI 53186
(262) 513-8500 (888) 745-6562
FAX: (262) 513-9069
http://www.surgivet.com

Sutter Instruments
51 Digital Drive
Novato, CA 94949
(415) 883-0128 FAX: (415) 883-0572
http://www.sutter.com

Swiss Precision Instruments
1555 Mittel Boulevard, Suite F
Wooddale, IL 60191
(800) 221-0198 FAX: (800) 842-5164

Synaptosoft
3098 Anderson Place
Decatur, GA 30033
(770) 939-4366 FAX: 770-939-9478
http://www.synaptosoft.com

SynChrom
See Micra Scientific

Synergy Software
2457 Perkiomen Avenue
Reading, PA 19606
(800) 876-8376 FAX: (610) 370-0548
(610) 779-0522
http://www.synergy.com

Synteni
See Incyte

Synthetics Industry
Lumite Division
2100A Atlantic Highway
Gainesville, GA 30501
(404) 532-9756 FAX: (404) 531-1347

Systat
See SPSS

Systems Planning and Analysis (SPA)
2000 N. Beauregard Street
Suite 400
Alexandria, VA 22311
(703) 931-3500
http://www.spa-inc.net

3M Bioapplications
3M Center
Building 270-15-01
St. Paul, MN 55144
(800) 257-7459 FAX: (651) 737-5645
(651) 736-4946

T Cell Diagnostics and T Cell Sciences
38 Sidney Street
Cambridge, MA 02139
(617) 621-1400

TAAB Laboratory Equipment
3 Minerva House
Calleva Park
Aldermaston, Berkshire RG7 8NA, UK
(44) 118 9817775
FAX: (44) 118 9817881

Taconic
273 Hover Avenue
Germantown, NY 12526
(800) TAC-ONIC FAX: (518) 537-7287
(518) 537-6208
http://www.taconic.com

Tago
See Biosource International

TaKaRa Biochemical
719 Alliston Way
Berkeley, CA 94710
(800) 544-9899 FAX: (510) 649-8933
(510) 649-9895
http://www.takara.co.jp/english

Takara Shuzo
Biomedical Group Division
Seta 3-4-1
Otsu Shiga 520-21, Japan
(81) 75-241-5100
FAX: (81) 77-543-9254
http://www.Takara.co.jp/english

Takeda Chemical Products
101 Takeda Drive
Wilmington, NC 28401
(800) 825-3328 FAX: (800) 825-0333
(910) 762-8666 FAX: (910) 762-6846
http://takeda-usa.com

TAO Biomedical
73 Manassas Court
Laurel Springs, NJ 08021
(609) 782-8622 FAX: (609) 782-8622

Tecan US
P.O. Box 13953
Research Triangle Park, NC 27709
(800) 33-TECAN FAX: (919) 361-5201
(919) 361-5208
http://www.tecan-us.com

Techne
University Park Plaza
743 Alexander Road
Princeton, NJ 08540
(800) 225-9243 FAX: (609) 987-8177
(609) 452-9275
http://www.techneusa.com

Technical Manufacturing
15 Centennial Drive
Peabody, MA 01960
(978) 532-6330 FAX: (978) 531-8682
http://www.techmfg.com

Technical Products International
5918 Evergreen
St. Louis, MO 63134
(800) 729-4451 FAX: (314) 522-6360
(314) 522-8671
http://www.vibratome.com

Technicon
See Organon Teknika Cappel

Techno-Aide
P.O. Box 90763
Nashville, TN 37209
(800) 251-2629 FAX: (800) 554-6275
(615) 350-7030
http://www.techno-aid.com

Ted Pella
4595 Mountain Lakes Boulevard
P.O. Box 492477
Redding, CA 96049
(800) 237-3526 FAX: (530) 243-3761
(530) 243-2200
http://www.tedpella.com

Tekmar-Dohrmann
P.O. Box 429576
Cincinnati, OH 45242
(800) 543-4461 FAX: (800) 841-5262
(513) 247-7000 FAX: (513) 247-7050

Tektronix
142000 S.W. Karl Braun Drive
Beaverton, OR 97077
(800) 621-1966 FAX: (503) 627-7995
(503) 627-7999
http://www.tek.com

Tel-Test
P.O. Box 1421
Friendswood, TX 77546
(800) 631-0600 FAX: (281)482-1070
(281)482-2672
http://www.isotex-diag.com

TeleChem International
524 East Weddell Drive, Suite 3
Sunnyvale, CA 94089
(408) 744-1331 FAX: (408) 744-1711
http://www.gst.net/~telechem

Terrachem
Mallaustrasse 57
D-68219 Mannheim, Germany
0621-876797-0 FAX: 0621-876797-19
http://www.terrachem.de

Terumo Medical
2101 Cottontail Lane
Somerset, NJ 08873
(800) 283-7866 FAX: (732) 302-3083
(732) 302-4900
http://www.terumomedical.com

Tetko
333 South Highland Manor
Briarcliff, NY 10510
(800) 289-8385 FAX: (914) 941-1017
(914) 941-7767
http://www.tetko.com

TetraLink
4240 Ridge Lea Road
Suite 29
Amherst, NY 14226
(800) 747-5170 FAX: (800) 747-5171
http://www.tetra-link.com

TEVA Pharmaceuticals USA
1090 Horsham Road
P.O. Box 1090
North Wales, PA 19454
(215) 591-3000 FAX: (215) 721-9669
http://www.tevapharmusa.com

Texas Fluorescence Labs
9503 Capitol View Drive
Austin, TX 78747
(512) 280-5223 FAX: (512) 280-4997
http://www.teflabs.com

The Nest Group
45 Valley Road
Southborough, MA 01772
(800) 347-6378 FAX: (508) 485-5736
(508) 481-6223
http://world.std.com/~nestgrp

ThermoCare
P.O. Box 6069
Incline Village, NV 89450
(800) 262-4020
(775) 831-1201

Thermo Labsystems
8 East Forge Parkway
Franklin, MA 02038
(800) 522-7763 FAX: (508) 520-2229
(508) 520-0009
http://www.finnpipette.com

Thermometric
Spjutvagen 5A
S-175 61 Jarfalla, Sweden
(46) 8-564-72-200

Thermoquest
IEC Division
300 Second Avenue
Needham Heights, MA 02194
(800) 843-1113 FAX: (781) 444-6743
(781) 449-0800
http://www.thermoquest.com

Thermo Separation Products
Thermoquest
355 River Oaks Parkway
San Jose, CA 95134
(800) 538-7067 FAX: (408) 526-9810
(408) 526-1100
http://www.thermoquest.com

Thermo Shandon
171 Industry Drive
Pittsburgh, PA 15275
(800) 547-7429 FAX: (412) 899-4045
http://www.thermoshandon.com

Thermo Spectronic
820 Linden Avenue
Rochester, NY 14625
(585) 248-4000 FAX: (585) 248-4200
http://www.thermo.com

Thomas Scientific
99 High Hill Road at I-295
Swedesboro, NJ 08085
(800) 345-2100 FAX: (800) 345-5232
(856) 467-2000 FAX: (856) 467-3087
http://www.wheatonsci.com/html/nt/Thomas.html

Thomson Instrument
354 Tyler Road
Clearbrook, VA 22624
(800) 842-4752 FAX: (540) 667-6878
(800) 541-4792 FAX: (760) 757-9367
http://www.hplc.com

Thorn EMI
See Electron Tubes

Thorlabs
435 Route 206
Newton, NJ 07860
(973) 579-7227 FAX: (973) 383-8406
http://www.thorlabs.com

Tiemann
See Bernsco Surgical Supply

TILL Photonics GmbH
Lochhamer Schlag 19
D-82166 Grafelfing
Germany
(49) 89-895-662-0
FAX: (49) 89-895-662-101
http://www.till-photonics.com/

Timberline Instruments
1880 South Flatiron Court, H-2
P.O. Box 20356
Boulder, CO 80308
(800) 777-5996 FAX: (303) 440-8786
(303) 440-8779
http://www.timberlineinstruments.com

TissueInformatics
711 Bingham Street, Suite 202
Pittsburgh, PA 15203
(418) 488-1100 FAX: (418) 488-6172
http://www.tissueinformatics.com

Tissue-Tek
A Division of Sakura Finetek USA
1750 West 214th Street
Torrance, CA 90501
(800) 725-8723 FAX: (310) 972-7888
(310) 972-7800
http://www.sakuraus.com

Tocris Cookson
114 Holloway Road, Suite 200
Ballwin, MO 63011
(800) 421-3701 FAX: (800) 483-1993
(636) 207-7651 FAX: (636) 207-7683
http://www.tocris.com

Tocris Cookson
Northpoint, Fourth Way
Avonmouth, Bristol BS11 8TA, UK
(44) 117-982-6551
FAX: (44) 117-982-6552
http://www.tocris.com

Tomtec
See CraMar Technologies

TopoGen
P.O. Box 20607
Columbus, OH 43220
(800) TOPOGEN
FAX: (800) ADD-TOPO
(614) 451-5810 FAX: (614) 451-5811
http://www.topogen.com

Toray Industries, Japan
Toray Building 2-1
Nihonbash-Muromach
2-Chome, Chuo-Ku
Tokyo, Japan 103-8666
(03) 3245-5115 FAX: (03) 3245-5555
http://www.toray.co.jp

Toray Industries, U.S.A.
600 Third Avenue
New York, NY 10016
(212) 697-8150 FAX: (212) 972-4279
http://www.toray.com

Toronto Research Chemicals
2 Brisbane Road
North York, Ontario
M3J 2J8 Canada
(416) 665-9696 FAX: (416) 665-4439
http://www.trc-canada.com

TosoHaas
156 Keystone Drive
Montgomeryville, PA 18036
(800) 366-4875 FAX: (215) 283-5035
(215) 283-5000
http://www.tosohaas.com

Towhill
647 Summer Street
Boston, MA 02210
(617) 542-6636 FAX: (617) 464-0804

Toxin Technology
7165 Curtiss Avenue
Sarasota, FL 34231
(941) 925-2032 FAX: (9413) 925-2130
http://www.toxintechnology.com

Toyo Soda
See TosoHaas

Trace Analytical
3517-A Edison Way
Menlo Park, CA 94025
(650) 364-6895 FAX: (650) 364-6897
http://www.traceanalytical.com

Transduction Laboratories
See BD Transduction Laboratories

Transgenomic
2032 Concourse Drive
San Jose, CA 95131
(408) 432-3230 FAX: (408) 432-3231
http://www.transgenomic.com

Transonic Systems
34 Dutch Mill Road
Ithaca, NY 14850
(800) 353-3569 FAX: (607) 257-7256
http://www.transonic.com

Travenol Lab
See Baxter Healthcare

Tree Star Software
20 Winding Way
San Carlos, CA 94070
800-366-6045
http://www.treestar.com

Trevigen
8405 Helgerman Court
Gaithersburg, MD 20877
(800) TREVIGEN FAX: (301) 216-2801
(301) 216-2800
http://www.trevigen.com

Trilink Biotechnologies
6310 Nancy Ridge Drive
San Diego, CA 92121
(800) 863-6801 FAX: (858) 546-0020
http://www.trilink.biotech.com

Tripos Associates
1699 South Hanley Road, Suite 303
St. Louis, MO 63144
(800) 323-2960 FAX: (314) 647-9241
(314) 647-1099
http://www.tripos.com

Triton Environmental Consultants
120-13511 Commerce Parkway
Richmond, British Columbia
V6V 2L1 Canada
(604) 279-2093 FAX: (604) 279-2047
http://www.triton-env.com

Tropix
47 Wiggins Avenue
Bedford, MA 01730
(800) 542-2369 FAX: (617) 275-8581
(617) 271-0045
http://www.tropix.com

TSI Center for Diagnostic Products
See Intergen

2000 Eppendorf-5 Prime
5603 Arapahoe Avenue
Boulder, CO 80303
(800) 533-5703 FAX: (303) 440-0835
(303) 440-3705

Tyler Research
10328 73rd Avenue
Edmonton, Alberta
T6E 6N5 Canada
(403) 448-1249 FAX: (403) 433-0479

UBI
See Upstate Biotechnology

Ugo Basile Biological Research Apparatus
Via G. Borghi 43
21025 Comerio, Varese, Italy
(39) 332 744 574
FAX: (39) 332 745 488
http://www.ugobasile.com

UltraPIX
See Life Science Resources

Ultrasonic Power
239 East Stephenson Street
Freeport, IL 61032
(815) 235-6020 FAX: (815) 232-2150
http://www.upcorp.com

Ultrasound Advice
23 Aberdeen Road
London N52UG, UK
(44) 020-7359-1718
FAX: (44) 020-7359-3650
http://www.ultrasoundadvice.co.uk

UNELKO
14641 N. 74th Street
Scottsdale, AZ 85260
(480) 991-7272 FAX: (480)483-7674
http://www.unelko.com

Unifab Corp.
5260 Lovers Lane
Kalamazoo, MI 49002
(800) 648-9569 FAX: (616) 382-2825
(616) 382-2803

Union Carbide
10235 West Little York Road, Suite 300
Houston, TX 77040
(800) 568-4000 FAX: (713) 849-7021
(713) 849-7000
http://www.unioncarbide.com

United Desiccants
See Sud-Chemie Performance Packaging

United States Biochemical
See USB

United States Biological (US Biological)
P.O. Box 261
Swampscott, MA 01907
(800) 520-3011 FAX: (781) 639-1768
http://www.usbio.net

Universal Imaging
502 Brandywine Parkway
West Chester, PA 19380
(610) 344-9410 FAX: (610) 344-6515
http://www.image1.com

Upchurch Scientific
619 West Oak Street
P.O. Box 1529
Oak Harbor, WA 98277
(800) 426-0191 FAX: (800) 359-3460
(360) 679-2528 FAX: (360) 679-3830
http://www.upchurch.com

Upjohn
Pharmacia & Upjohn
http://www.pnu.com

Upstate Biotechnology (UBI)
1100 Winter Street, Suite 2300
Waltham, MA 02451
(800) 233-3991 FAX: (781) 890-7738
(781) 890-8845
http://www.upstatebiotech.com

USA/Scientific
346 SW 57th Avenue
P.O. Box 3565
Ocala, FL 34478
(800) LAB-TIPS FAX: (352) 351-2057
(3524) 237-6288
http://www.usascientific.com

USB
26111 Miles Road
P.O. Box 22400
Cleveland, OH 44122
(800) 321-9322 FAX: (800) 535-0898
FAX: (216) 464-5075
http://www.usbweb.com

USCI Bard
Bard Interventional Products
129 Concord Road
Billerica, MA 01821
(800) 225-1332 FAX: (978) 262-4805
http://www.bardinterventional.com

UVP (Ultraviolet Products)
2066 W. 11th Street
Upland, CA 91786
(800) 452-6788 FAX: (909) 946-3597
(909) 946-3197
http://www.uvp.com

V & P Scientific
9823 Pacific Heights Boulevard, Suite T
San Diego, CA 92121
(800) 455-0644 FAX: (858) 455-0703
(858) 455-0643
http://www.vp-scientific.com

V-A Optical Labs
60 Red Hill Ave.
San Anselmo, CA 94960
(415) 459-1919 FAX: (415) 459-7216
http://www.vaoptical.com/

Valco Instruments
P.O. Box 55603
Houston, TX 77255
(800) FOR-VICI FAX: (713) 688-8106
(713) 688-9345
http://www.vici.com

Valpey Fisher
75 South Street
Hopkin, MA 01748
(508) 435-6831 FAX: (508) 435-5289
http://www.valpeyfisher.com

Value Plastics
3325 Timberline Road
Fort Collins, CO 80525
(800) 404-LUER FAX: (970) 223-0953
(970) 223-8306
http://www.valueplastics.com

Vangard International
P.O. Box 308
3535 Rt. 66, Bldg. #4
Neptune, NJ 07754
(800) 922-0784 FAX: (732) 922-0557
(732) 922-4900
http://www.vangard1.com

Varian Analytical Instruments
2700 Mitchell Drive
Walnut Creek, CA 94598
(800) 926-3000 FAX: (925) 945-2102
(925) 939-2400
http://www.varianinc.com

Varian Associates
3050 Hansen Way
Palo Alto, CA 94304
(800) 544-4636 FAX: (650) 424-5358
(650) 493-4000
http://www.varian.com

Vector Core Laboratory/
National Gene Vector Labs
University of Michigan
3560 E MSRB II
1150 West Medical Center Drive
Ann Arbor, MI 48109
(734) 936-5843 FAX: (734) 764-3596

Vector Laboratories
30 Ingold Road
Burlingame, CA 94010
(800) 227-6666 FAX: (650) 697-0339
(650) 697-3600
http://www.vectorlabs.com

Vedco
2121 S.E. Bush Road
St. Joseph, MO 64504
(888) 708-3326 FAX: (816) 238-1837
(816) 238-8840
http://database.vedco.com

Ventana Medical Systems
3865 North Business Center Drive
Tucson, AZ 85705
(800) 227-2155 FAX: (520) 887-2558
(520) 887-2155
http://www.ventanamed.com

Verity Software House
P.O. Box 247
45A Augusta Road
Topsham, ME 04086
(207) 729-6767 FAX: (207) 729-5443
http://www.vsh.com

Vernitron
See Sensor Systems LLC

Vertex Pharmaceuticals
130 Waverly Street
Cambridge, MA 02139
(617) 577-6000 FAX: (617) 577-6680
http://www.vpharm.com

Vetamac
Route 7, Box 208
Frankfort, IN 46041
(317) 379-3621

Vet Drug
Unit 8
Lakeside Industrial Estate
Colnbrook, Slough SL3 0ED, UK

Vetus Animal Health
See Burns Veterinary Supply

Viamed
15 Station Road
Cross Hills, Keighley
W. Yorkshire BD20 7DT, UK
(44) 1-535-634-542
FAX: (44) 1-535-635-582
http://www.viamed.co.uk

Vical
9373 Town Center Drive, Suite 100
San Diego, CA 92121
(858) 646-1100 FAX: (858) 646-1150
http://www.vical.com

Victor Medical
2349 North Watney Way, Suite D
Fairfield, CA 94533
(800) 888-8908 FAX: (707) 425-6459
(707) 425-0294

Virion Systems
9610 Medical Center Drive, Suite 100
Rockville, MD 20850
(301) 309-1844 FAX: (301) 309-0471
http://www.radix.net/~virion

VirTis Company
815 Route 208
Gardiner, NY 12525
(800) 765-6198 FAX: (914) 255-5338
(914) 255-5000
http://www.virtis.com

Visible Genetics
700 Bay Street, Suite 1000
Toronto, Ontario
M5G 1Z6 Canada
(888) 463-6844 (416) 813-3272
http://www.visgen.com

Vitrocom
8 Morris Avenue
Mountain Lakes, NJ 07046
(973) 402-1443 FAX: (973) 402-1445

VTI
7650 W. 26th Avenue
Hialeah, FL 33106
(305) 828-4700 FAX: (305) 828-0299
http://www.vticorp.com

VWR Scientific Products
200 Center Square Road
Bridgeport, NJ 08014
(800) 932-5000 FAX: (609) 467-5499
(609) 467-2600
http://www.vwrsp.com

Vydac
17434 Mojave Street
P.O. Box 867
Hesperia, CA 92345
(800) 247-0924 FAX: (760) 244-1984
(760) 244-6107
http://www.vydac.com

Vysis
3100 Woodcreek Drive
Downers Grove, IL 60515
(800) 553-7042 FAX: (630) 271-7138
(630) 271-7000
http://www.vysis.com

W&H Dentalwerk Burmoos
P.O. Box 1
A-5111 Burmoos, Austria
(43) 6274-6236-0
FAX: (43) 6274-6236-55
http://www.wnhdent.com

Wako BioProducts
See Wako Chemicals USA

Wako Chemicals USA
1600 Bellwood Road
Richmond, VA 23237
(800) 992-9256 FAX: (804) 271-7791
(804) 271-7677
http://www.wakousa.com

Wako Pure Chemicals
1-2, Doshomachi 3-chome
Chuo-ku, Osaka 540-8605, Japan
81-6-6203-3741 FAX: 81-6-6222-1203
http://www.wako-chem.co.jp/egaiyo/
index.htm

Wallac
See Perkin-Elmer

Wallac
A Division of Perkin-Elmer
3985 Eastern Road
Norton, OH 44203
(800) 321-9632　FAX: (330) 825-8520
(330) 825-4525
http://www.wallac.com

Waring Products
283 Main Street
New Hartford, CT 06057
(800) 348-7195　FAX: (860) 738-9203
(860) 379-0731
http://www.waringproducts.com

Warner Instrument
1141 Dixwell Avenue
Hamden, CT 06514
(800) 599-4203　FAX: (203) 776-1278
(203) 776-0664
http://www.warnerinstrument.com

Warner-Lambert
Parke-Davis
201 Tabor Road
Morris Plains, NJ 07950
(973) 540-2000　FAX: (973) 540-3761
http://www.warner-lambert.com

Washington University Machine Shop
615 South Taylor
St. Louis, MO 63310
(314) 362-6186　FAX: (314) 362-6184

Waters Chromatography
34 Maple Street
Milford, MA 01757
(800) 252-HPLC　FAX: (508) 478-1990
(508) 478-2000
http://www.waters.com

Watlow
12001 Lackland Road
St. Louis, MO 63146
(314) 426-7431　FAX: (314) 447-8770
http://www.watlow.com

Watson-Marlow
220 Ballardvale Street
Wilmington, MA 01887
(978) 658-6168　FAX: (978) 988 0828
http://www.watson-marlow.co.uk

Waukesha Fluid Handling
611 Sugar Creek Road
Delavan, WI 53115
(800) 252-5200　FAX: (800) 252-5012
(414) 728-1900　FAX: (414) 728-4608
http://www.waukesha-cb.com

WaveMetrics
P.O. Box 2088
Lake Oswego, OR 97035
(503) 620-3001　FAX: (503) 620-6754
http://www.wavemetrics.com

Weather Measure
P.O. Box 41257
Sacramento, CA 95641
(916) 481-7565

Weber Scientific
2732 Kuser Road
Hamilton, NJ 08691
(800) FAT-TEST　FAX: (609) 584-8388
(609) 584-7677
http://www.weberscientific.com

Weck, Edward & Company
1 Weck Drive
Research Triangle Park, NC 27709
(919) 544-8000

Wellcome Diagnostics
See Burroughs Wellcome

Wellington Laboratories
398 Laird Road
Guelph, Ontario
N1G 3X7 Canada
(800) 578-6985　FAX: (519) 822-2849
http://www.well-labs.com

Wesbart Engineering
Daux Road
Billingshurst, West Sussex
RH14 9EZ, UK
(44) 1-403-782738
FAX: (44) 1-403-784180
http://www.wesbart.co.uk

Whatman
9 Bridewell Place
Clifton, NJ 07014
(800) 631-7290　FAX: (973) 773-3991
(973) 773-5800
http://www.whatman.com

Wheaton Science Products
1501 North 10th Street
Millville, NJ 08332
(800) 225-1437　FAX: (800) 368-3108
(856) 825-1100　FAX: (856) 825-1368
http://www.algroupwheaton.com

Whittaker Bioproducts
See BioWhittaker

Wild Heerbrugg
Juerg Dedual Gaebrisstrasse 8 CH
9056 Gais, Switzerland
(41) 71-793-2723
FAX: (41) 71-726-5957
http://www.homepage.swissonline.net/dedual/wild˙heerbrugg

Willy A. Bachofen AG Maschinenfabrik
Utengasse 15/17
CH4005 Basel, Switzerland
(41) 61-681-5151
FAX: (41) 61-681-5058
http://www.wab.ch

Winthrop
See Sterling Winthrop

Wolfram Research
100 Trade Center Drive
Champaign, IL 61820
(800) 965-3726　FAX: (217) 398-0747
(217) 398-0700
http://www.wolfram.com

World Health Organization
Microbiology and Immunology Support
20 Avenue Appia
1211 Geneva 27, Switzerland
(41-22) 791-2602
FAX: (41-22) 791-0746
http://www.who.org

World Precision Instruments
175 Sarasota Center Boulevard
International Trade Center
Sarasota, FL 34240
(941) 371-1003　FAX: (941) 377-5428
http://www.wpiinc.com

Worthington Biochemical
Halls Mill Road
Freehold, NJ 07728
(800) 445-9603　FAX: (800) 368-3108
(732) 462-3838　FAX: (732) 308-4453
http://www.worthington-biochem.com

WPI
See World Precision Instruments

Wyeth-Ayerst
2 Esterbrook Lane
Cherry Hill, NJ 08003
(800) 568-9938　FAX: (858) 424-8747
(858) 424-3700

Wyeth-Ayerst Laboratories
P.O. Box 1773
Paoli, PA 19301
(800) 666-7248　FAX: (610) 889-9669
(610) 644-8000
http://www.ahp.com

Xenotech
3800 Cambridge Street
Kansas City, KS 66103
(913) 588-7930　FAX: (913) 588-7572
http://www.xenotechllc.com

Xeragon
19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
(240) 686-7860　FAX: (240)686-7861
http://www.xeragon.com

Xillix Technologies
300-13775 Commerce Parkway
Richmond, British Columbia
V6V 2V4 Canada
(800) 665-2236　FAX: (604) 278-3356
(604) 278-5000
http://www.xillix.com

参考文献

AABB. 1997. Parentage Testing Standards Committee Annual Report Summary. American Association of Blood Banks, Arlington, Va.

Abbott, C. and Povey, S. 1991. Development of human chromosome-specific PCR primers for the characterization of somatic cell hybrids. *Genomics* 9:73–77.

Abbs, S., Yau, S.C., Clark, S., Mathew, C.G., and Bobrow, M. 1991. A convenient multiplex PCR system for the detection of dystrophin gene deletions: A comparative analysis with cDNA hybridization shows mistypings by both methods. *J. Med. Genet.* 28:304–311.

Abecasis, G.R., Cookson, W.O.C., and Cardon, L.R. 2000. Pedigree tests of transmission disequilibrium. *Eur. J. Hum. Genet.* 8:545–551.

ACMG (American College of Medical Genetics). 1993. Prenatal interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) policy statement. *Am. J. Hum. Genet.* 53:526–627.

Aihara, H. and Miyazaki, J. 1998. Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. *Nat. Biotechnol* 16:867–870.

Akeson, E.C. and Davisson, M.T. 2000. Centromeric heterochromatin variants. In Genteic Variants and Strains of the Laboratory Mouse, Vol. 2 (M.F. Lyon, S. Rastan, and S.D.M. Brown, eds.) pp 1506–1509. Oxford University Press, Oxford.

Akli, S., Caillaud, C., Vigne, E., Stratford-Perricaudet, L.D., Ponaru, L., Perricaudet, M., Kahn, A., and Peschanski, M.R. 1993. Transfer of a foreign gene into the brain using adenovirus vectors. *Nat. Genet.* 3:224–228.

Akyurek, L.M., Yang, Z.Y., Aoki, K., San, H., Nabel, G.J., Parmacek, M.S., and Nabel, E.G. 2000. SM22alpha promoter targets gene expression to vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Mol. Med* 6:983–991.

Albertsen, H.M., Abderrahim, H., Cann, H.M., Dausset, J., Le Paslier, D., and Cohen, D. 1990. Construction and characterization of a yeast artificial chromosome library containing seven haploid equivalents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:4256–4260.

Allen, R.W., Wallhermfechtel, M., and Miller, W.V. 1990. The application of restriction fragment length polymorphism mapping to parentage testing. *Transfusion* 30:552–564.

Allen, R., Zoghbi, H., Moseley, A., Rosenblatt, H., and Belmont, J. 1992. Methylation of *Hpa*II and *Hha*I sites near the polymorphic CA repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromsome inactivation. *Am. J. Hum. Genet.* 51:1229–1239.

Almasy, L. and Blangero, J. 1998. Multipoint quantitative-trait linkage analysis in general pedigrees. *Am. J. Hum. Genet.* 62:1198–1211.

Altman, J. and Bayer, S. 1995. Atlas of Prenatal Rat Brain Development. CRC Press, Boca Raton, Fla.

Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., and Lipman, D. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403–410.

Alvira, M.R., Cohen, J.B., Goins, W.F., and Glorioso, J.C. 1999. Genetic studies exposing the splicing events involved in HSV-1 latency associated transcript (LAT) production during lytic and latent infection. *J. Virol.* 73:3866–3876.

Alwine, J.C., Kemp, D.J., and Stark, G.R. 1977. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74:5350–5354.

Amara, R.R., Villinger, F., Altman, J.D., Lydy, S.L., O'Neil, S.P., Staprans, S.I., Montefiori, D.C., Xu, Y., Herndon, J.G., Wyatt, L.S., Candido, M.A., Kozyr, N.L., Earl, P.L., Smith, J.M., Ma, H.L., Grimm, B.D., Hulsey, M.L., Miller, J., McClure, H.M., McNicholl, J.M., Moss, B., and Robinson, H.L. 2001. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science* 292:69–74.

Antoch, M.P., Song, E.J., Chang, A.M., Vitaterna, M.H., Zhao, Y., Wilsbacher, L.D., Sangoram, A.M., King, D.P., Pinto, L.H., and Takahashi, J.S. 1997. Functional identification of the mouse circadian Clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell* 89:655–667.

Antonarakis, S.E. and the Nomenclature Working Group. 1998. Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. *Hum. Mutat.* 11:1–3.

Arnheim, N. and Shibata, D. 1997. DNA mismatch repair in mammals: Role in disease and meiosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7:364–370.

Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M., and Sherlock, G. 2000. Gene Ontology: Tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet* 25:25–29.

Athwal, R.S., Smarsh, M., Searle, B.M., and Deo, S.S. 1985. Integration of a dominant selectable marker into human chromosomes and transfer of marked chromosomes to mouse cells by microcell fusion. *Somatic Cell Mol. Genet.* 11:177–187.

Auerbach, A.D. 1993. Fanconi anemia diagnosis and the diepoxybutane (DEB) test. *Exp. Hematol.* 21:731–733.

Auerbach, A.D., Rogatko, A., and Schroeder-Kurth, T.M. 1989. International Fanconi Anemia Registry: Relation of clinical symptoms to diepoxybutane sensitivity. *Blood* 73:391–396.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. 2004. The Polymerase Chain Reaction. *In* Current Protocols in Molecular Biology. Chapter 15. John Wiley & Sons, New York.

Barch, M.J., (ed.) 1997. The ACT Cytogenetics Laboratory Manual, 3rd ed. Lippincott-Raven, Philadelphia.

Barr, E. and Leiden, J.M. 1991. Systemic delivery of recombinant proteins by genetically modified myoblasts. *Science* 254:1507–1509.

Baxevanis, A.D., Boguski, M.S., and Ouellette, B.F.F. 1997. Computational analysis of DNA and protein sequences. *In* Genome Analysis: A Laboratory Manual (B. Birren, E.D. Green, S. Kapholz, R.M. Myers, and J. Roskams, eds.) pp. 533–586. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Becker, T.C., Noel, R.J., Coats, W.S., Gomez-Foix, A.M., Alam, T., Gerard, R.D., and Newgard, C.B. 1994. Use of recombinant adenovirus for metabolic engineering of mammalian cells. *Methods Cell Biol.* 43:161–189.

Beggs, A.H. and Kunkel, L.M. 1990. A polymorphic CACA repeat in the 3′ untranslated region of dystrophin. *Nucl. Acids Res.* 18:1931.

Beggs, A.H., Koenig, M., Boyce, F.M., and Kunkel, L.M. 1990. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum. Genet.* 86:45–48.

Beggs, A.H., Hoffman, E.P., Snyder, J.R., Arahata, K., Specht, L., Shapiro, F., Angelini, C., Sugita, H., and Kunkel, L.M. 1991. Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: Dystrophin gene and protein studies. *Am. J. Hum. Genet.* 49:54–67.

Benjamini, Y. and Hochberg, Y. 1995. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Statist. Soc. B* 57:2889–3000.

Bentley, D.R., Todd, C., Collins, J., Holland, J., Dunham, I., Hassock, S., Bankier, A., and Giannelli, F. 1992. The development and application of automated gridding for efficient screening of yeast and bacterial ordered libraries. *Genomics* 12:534–541.

Beroud, C., Collod-Beroud, G., Boileau, C., Soussi, T., and Junien, C. 2000. UMD (Universal Mutation Database): A generic software to build and analyze locus-specific databases. *Hum. Mutat.* 15:86–94.

Birren, B. and Lai, E. 1993. Pulsed field gel electrophoresis: A practical guide. Academic Press, San Diego.

Blackwelder, W.C. and Elston, R.C. 1985. A comparison of sib pair linkage tests for disease susceptibility loci. *Genet. Epidemiol.* 2:5–97.

Blanco-Bose, W.E., Yao, C.C., Kramer, R.H., and Blau, H.M. 2001. Purification of mouse primary myoblasts based on alpha 7 integrin expression. *Exp. Cell Res.* 265:212–220.

Blonden, L.A., den Dunnen, J.T., van Paassen, H.M., Wapenaar, M.C., Grootscholten, P.M., Ginjaar, H.B., Bakker, E., Pearson, P.L., and van Ommen, G.J. 1989. High resolution deletion breakpoint mapping in the DMD gene by whole cosmid hybridization. *Nucl. Acids Res.* 17:5611–5621.

Boguski, M.S., Lowe, T.M., and Tolstoshev, C.M. 1993. dbEST: Database for "Expressed Sequence Tags". *Nat. Genet.* 4:332–333.

Botstein, D., Falco, S.C., Stewart, S.E., Brennan, M., Schere, S., Stinchcomb, D.T., Struhl, K., and Davis, R.W. 1979. Sterile host yeasts (SHY): A eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments. *Gene* 8:17–24.

Boyce, F.M., Beggs, A.H., Feener, C., and Kunkel, L.M. 1991. Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:1276–1280.

Brenner, C.H. 1997. Symbolic kinship program. *Genetics* 145:535–542.

Brenner, C.H. and Morris, J. 1989. Paternity index calculations in single locus hypervariable probes: Validation and other studies. *In* Proceedings for the International Symposium on Human Identification Data Acquisitions and Statistical Analysis, pp. 21–53. Promega Corporation, Madison, WI.

Brambati, B., Oldrini, A., Ferrazzi, J., and Lanzani, A. 1987. Chorionic villus sampling: An analysis of the obstetric experience of 1000 cases. *Prenatal Diagn.* 7:157–169.

Brown, A. and McKie, M. 2000. MuStaR and other software for locus-specific mutation databases. *Hum. Mutat.* 15:76–85.

Burge, C. and Karlin, S. 1997. Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *J. Mol. Biol* 268:78–94.

Burke, D., Carle, G., and Olson, M.V. 1987. Cloning of large segments of DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 236:806–812.

Burset, M. and Guigo, R. 1996. Evaluation of gene structure prediction programs. *Genomics* 34:353–367.

Cabin, D.E., Hawkins, A., Griffin, C., and Reeves, R.H. 1995. YAC transgenic mice in the study of the genetic basis of Down syndrome. *Progr. Clin. Biol. Res.* 393:213–226.

Cayatte, A.J., Du, Y., Oliver-Krasinski, J., Lavielle, G., Verbeuren, T.J., and Cohen, R.A. 2000. The thromboxane receptor antagonist S18886 but not aspirin inhibits atherogenesis in apo E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 20:1724–1728.

Chamberlain, J.S., Gibbs, R.A., Ranier, J.E., Nguyen, P.N., and Caskey, C.T. 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucl. Acids Res.* 16:11141–11156.

Chamberlain, J.S., Gibbs, R.A., Ranier, J.E., and Caskey, C.T. 1990. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. *In* PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White, eds.) pp. 272–281. Academic Press, San Diego.

Chang, M.W., Barr, E., Seltzer, J., Jiang, Y.-Q., Nabel, G.J., Nabel, E.G., Parmacek, M.S., and Leiden, J.M. 1995. Cytostatic gene therapy for vascular proliferative disorders with a constitutively active form of the retinoblastoma gene product. *Science* 267:518–522.

Chen, J. N., Haffter, P., Odenthal, J., Vogelsang, E., Brand, M., van Eeden, F.J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C.P., Jiang, Y.J., Kane, D.A., Kelsh, R.N., Mullins, M.C., and Nusslein-Volhard, C. 1996a. Mutations affecting the cardiovascular system and other internal organs in zebrafish. *Development* 123:293–302.

Chen, S.T., Iida, A., Guo, L., Friedmann, T., and Yee, J.K. 1996b. Generation of packaging cell lines for VSV-G pseudotyped retroviral vectors using a modified tetracycline-inducible system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:10057–10062.

Chen, X., Levine, L., and Kwok, P.-Y. 1999. Fluorescence polarization in homogeneous nucleic acid analysis. *Genome Res.* 9:492–498.

Cheng, S., Higuchi, R., and Stoneking, M. 1994. Complete mitochondrial genome amplification. *Nat. Genet.* 7:350–351.

Cisterni, C., Henderson, C.E., Aebischer, P., Pettmann, B., and Deglon, N. 2000. Efficient gene transfer and expression of biologically active glial cell line-derived neurotrophic factor in rat motoneurons transduced with lentiviral vectors. *J. Neurochem.* 74:1820–1828.

Claustres, M., Horaitis, O., Vanevski, M., and Cotton, R.G.H. 2002. Time for a unified system of mutation description and reporting: A review of locus specific mutation databases. *Genome Res.* 12:680–688.

Claverie, J.M. 1997a. Computational methods for the identification of genes in vertebrate genomic sequences. *Hum. Mol. Genet.* 6:1735–1744.

Claverie, J.M. 1997b. Exon detection by similarity searches. *Methods Mol. Biol.* 68:283–313.

Claverie, J.M. 1998. Computational methods for exon detection. *Mol. Biotechnol.* 10:27–48.

Coffey, A.J., Roberts, R.G., Green, E.D., Cole, C.G., Butler, R., Anand, R., Giannelli, F., and Bentley, D.R. 1992. Construction of a 2.6-Mb contig in yeast artificial chromosomes spanning the human dystrophin gene using an STS-based approach. *Genomics* 12:474–484.

Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M., and Strober, W. (eds.) 2004. Current Protocols in Immunology. John Wiley & Sons, Hoboken, N.J.

Cosset, F.-L., Takeuchi, Y., Battini, J.L., Weiss, R.A., and Collins, M.K. 1995. High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J. Virol.* 69:7430–7436.

Cotton, R.G. and Scriver, C.R. 1998. Proof of "disease causing" mutation. *Hum. Mutat.* 12:1–3.

Covone, A.E., Caroli, F., and Romeo, G. 1992. Screening Duchenne and Becker muscular dystrophy patients for deletions in 30 exons of the dystrophin gene by three-multiplex PCR. *Am. J. Hum. Genet.* 51:675–677.

Cowell, J.K. 1984. A photographic representation of the variability in the G-banded structure of the chromosomes in the mouse karyotype. A guide to the identification of the individual chromosomes. *Chromosoma (Berl)* 89:294–320.

CRC (Chemical Rubber Company). 1975. CRC Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Physical and Chemical Data, 3rd ed., Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, Fla.

Cremer, T., Lichter, P., Borden, J., Ward, D.C., and Manuelidis, L. 1988. Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. *Hum. Genet.* 80:235–246.

Cunningham, C. and Davison, A.J. 1993. A cosmid-based system for constructing mutants of herpes simplex virus type 1. *Virology* 197:116–124.

Dahlquist, K.D., Salomonis, N., Vranizan, K., Lawlor, S.C., and Conklin, B.R. 2002. GenMAPP, a new tool for viewing and analyzing microarray data on biological pathways. *Nat. Genet.* 31:19–20.

Danos, O. and Mulligan, R.C. 1988. Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:6460–6464.

Davis, S. and Weeks, D.E. 1997. Comparison of nonparametric statistics for detection of linkage analysis in nuclear families: Single marker evaluation. *Am. J. Hum. Genet.* 61:1431–1444.

Dawson, M.C., Elliott, D.C., Elliott, W.H., and Jones, K.M., (eds.). 1986. Data for Biochemical Research. Alden Press, London.

Dean, M., White, M.B., Amos, J., Gerrard, B., Stewart, C., Khaw, K.-T., and Leppert, M. 1990. Multiple mutations in highly conserved residues are found in mildly affected cystic fibrosis patients. *Cell* 61:863–870.

Deglon, N., Tseng, J.L., Bensadoun, J.C., Zurn, A.D., Arsenijevic, Y., Pereira de Almeida, L., Zufferey, R., Trono, D., and Aebischer, P. 2000. Self-inactivating lentiviral vectors with enhanced transgene expression as potential gene transfer system in Parkinson's disease. *Hum. Gene Ther.* 11:179–190.

DeLuca, N.A., McCarthy, A.M., and Schaffer, P.A. 1985. Isolation and characterization of deletion mutants of herpes simplex virus type 1 in the gene encoding immediate-early regulatory protein ICP4. *J. Virol.* 56:558–570.

den Dunnen, J.T. and Antonarakis, S.E. 2000. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: A discussion. *Hum. Mutat.* 15:7–12.

den Dunnen, J.T. and van Ommen, G.J.B. 1999. The Protein Truncation Test: A review. *Hum. Mutat.* 14:95–102.

DeRisi, J.L., Iyer, V.R., and Brown, P.O. 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278:680–686.

DeVries, D.D., Went, L.N., Bruyn, G.W., Scholte, H.R., Hofstra, R.M.W., Bolhuis, P.A., and van Oost, B.A. 1996. Genetic and biochemical impairment of mitochondrial complex I activity in a family with Lebec hereditary optic neuropathy and hereditary spastic dystonia. *Am. J. Hum. Genet.* 58:703–711.

Dib, C., Faure, S., Fizames, C., Samson, D., Drouot, N., Vignal, A., Millasseau, P., Marc, S., Hazan, J., Seboun, E., Lathrop, M., Gyapay, G., Morissette, J., and Weissenbach, J. 1996. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 380:152–154.

Dougherty, J.P., Wisniewski, R., Yang, S., Rhode, B.W., and Temin, H.M. 1989. New retrovirus helper cells with almost no nucleotide sequence homology to retrovirus vectors. *J. Virol.* 63:3209–3212.

Draghia-Akli, R., Fiorotto, M.L., Hill, L.A., Malone, P.B., Deaver, D.R., and Schwartz, R.J. 1999. Myogenic expression of an injectable protease-resistant growth hormone-releasing hormone augments long-term growth in pigs. *Nat. Biotechnol.* 17:1179–1183.

Du Manoir, S., Schroeck, E., Bentz, M., Speicher, M.R., Joos, S., Ried, T., Lichter, P., and Cremer, T. 1995. Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 19.1:27–41.

Dubois, B.L. and Naylor, S.L. 1993. Characterization of NIGMS human/rodent somatic cell hybrid mapping panel 2 by PCR. *Genomics* 16:315–319.

Dudoit, S., Fridlyand, J., and Speed, T. 2000. Comparison of Discrimination Methods for the Classification of Tumors Using Gene Expression Data. Tech. Rep. 576, Dept. of Statistics, University of California, Berkeley, Calif.

Durbin, B.P., Hardin, J.S., Hawkins, D.M., and Rocke, D.M. 2002. A variance-stabilizing transformation for gene expression microarray data. *Bioinformatics* 18:S105–S110.

Eichinger, D.J. and Boeke, J.D. 1988. The DNA intermediate in yeast Ty1 element transposition copurifies with virus-like particles: Cell-free Ty1 transposition. *Cell* 54:955–966.

Eichner, J.E., Terence Dunn, S., Perveen, G., Thompson, D.M., Stewart, K.E., and Stroehla, B.C. 2002. Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: A HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* 487–495.

Elston, R.C., Guo, X., and Williams, L.V. 1996. Two-stage global search designs for linkage analysis using pairs of affected relatives. *Genet. Epidemiol.* 13:535–558.

Endean, D. 1989. RFLP analysis and paternity testing: Observations and caveats. *In* Proceedings for the International Symposium on Human Identification Data Acquisition and Statistical Analysis, pp. 55–75. Promega Corporation, Madison, Wis.

Endean, D. 1995. Apparent false exclusion observed in various DNA-VNTR systems reported by AABB-accredited parentage testing laboratories. *In* American Association of Blood Banks, Accreditation Requirements Manual, 2nd ed., pp. 66. American Association of Blood Banks, Arlington, Va.

Engelhardt, J.F. and Wilson, J.M. 1997. Explant models of the airway. *In* The Lung (R.G. Crystal, J.B. West, P.J. Barnes, and E.R. Weibel, eds.) pp. 345–352. Raven Press, New York.

Engelhardt, J.F., Yankaskas, J.R., and Wilson, J.M. 1992. In vivo retroviral gene transfer into human bronchial epithelia of xenografts. *J. Clin. Invest*. 90:2598–2607.

ESHRE PGD Consortium Steering Committee. 1999. ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) Consortium: Preliminary assessment of data from January 1997-September 1998. *Europ. Soc. Hum. Reprod. Embryol.* 14:3138–3148.

Evans, E.P. 1996. Standard idiogram. *In* Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse, Vol. 2 (M.F. Lyon, S. Rastan, and S.D.M. Brown, eds.) pp. 1446–1448. Oxford University Press, Oxford.

Fabrizi, G.M., Tiranti, V., Mariotti, C. Guazzi, G.C., Malandrini, A., DiDonato, S., and Zeviani, M. 1995. Sequence analysis of mitochondrial DNA in a new inherited encephalomyopathy. *J. Neurol.* 242:490–496.

Fan, J.-B., Chen, X., Halushka, M.K., Berno, A., Huang, X., Ryder, T., Lipshutz, R.J., Lockhart, D.J., and Chakravarti, A. 2000. Parallel genotyping of human SNPs using generic high-density oligonucleotide tag arrays. *Genome Res.* 10:853–860.

Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., and Danielsen, M. 1987. Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:7413–7417.

Ferrie, R.M., Schwarz, M.J., Robertson, N.H., Vaudin, S., Super, M., Malone, G., and Little, S. 1992. Development, multiplexing and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene. *Am. J. Hum. Genet.* 51:251–262.

Ferry, N. and Heard, J.M. 1998. Liver-directed gene transfer vectors. *Hum. Gene Ther*. 9:1974–1981.

Fisher, L.J., Jinnah, H.A., Kale, L.C., Higgins, G.A., and Gage, F.H. 1991. Survival and function of intrastriatally grafted primary fibroblasts genetically modified to produce L-dopa. *Neuron* 6:371–380.

Fleming, D.O., Richardson, J.H., Tulis, J.I., and Vesley, D. (eds.) 1995. Laboratory Safety: Principles and Practices, 2nd ed. ASM Press (American Society for Microbiology), Washington, D.C.

Fletcher, J.A., Pinkus, G.S., Weidner, N., and Morton, C.C. 1991. Lineage-restricted clonality in biphasic solid tumors. *Am. J. Path.* 138:1199–1207.

Flint, S.J., Enquist, L.W., Krug, R.M., Racaniello, V.R., and Skalka, A.M. 1999. Virology, Molecular Biology, Pathogenesis and Control. ASM Press (American Society for Microbiology), Washington, D.C.

Fraefel, C., Song, S., Lim, F., Lang, P., Yu, L., Wang, Y., Wild, P., and Geller, A.I. 1996. Helper virus-free transfer of herpes simplex virus type 1 plasmid vectors into neural cells. *J. Virol.* 70:7190–7197.

Francke, U. 1981. High resolution ideograms of trypsin-Giemsa banded human chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* 31:24–32.

Freshney, R.I. 1993. Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Techniques, 3rd ed. Wiley-Liss, New York.

Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L., and Paul, C.L. 1992. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 89:1827–1831.

Fu, K., Hartlen, R., Johns, T., Genge, A., Karpati, G., and Shoubridge, E.A. 1996. A novel heteroplasmic $tRNA^{leu(CUN)}$ mtDNA point mutation in a sporadic patient with mitochondrial encephalomyopathy segregates rapidly in skeletal muscle and suggests an approach to therapy. *Hum. Mol. Genet.* 5:1835–1840.

Gao, X. and Huang, L. 1991. A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179:280–285.

Gao, X. and Huang, L. 1995. Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther.* 2:710–722.

Garber, R.A. and Morris, J.W. 1983. General equations for the average power of exclusion for genetic systems of n codominant alleles in one-parent and no-parent cases of disputed parentage. *In* Inclusion Probabilities in Parentage Testing (R.H. Walker, ed.). American Association of Blood Banks, Arlington, Va.

Gasch, A.P. and Eisen, M. 2002. Exploring the conditional coregulation of yeast through fuzzy *k*-means clustering. *Genome Biol.* 3:RESEARCH0059.

Gauderman, W.J. 2002. Sample size requirements for association studies of gene-gene interaction. *Am. J. Epidemiol.* 155:478–484.

Gemmill, R. 1990. Pulsed field gel electrophoresis. *Adv. Electrophor.* 4:1–48.

Gillin, F.D., Roufa, D.J., Beaudet, A.L., and Caskey, C.T. 1972. 8-Azaguanine resistance in mammalian cells. I. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Genetics* 72:239–252.

Gjertson, D.W. and Endean, D. 1996. Promega Statistics Workshop, Scottsdale, Ariz.

Golub, T.R., Slonim, D.K. Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J.P., Coller, H., Loh, M.L., Downing, J.R., Caligiuri, M.A., et al. 1999. Molecular classification of cancer: Class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286:531–537.

Goradia, T.M. and Lange, K. 1990. Multilocus ordering strategies based on sperm typing. *Ann. Hum. Genet.* 54:49–77.

Gritz, L., and Davies J. 1983. Plasmid-encoded hygromycin B resistance: The sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 25:179–188.

Guigo, R. 1997. Computational gene identification. *J. Mol. Med* 75:389–393.

Haines, J.L. and Pericak-Vance, M.A. 1998. Approaches to Gene Mapping in Complex Human Diseases. John Wiley & Sons, New York.

Hammans, S.R. Sweeney, M.G. Brockington, M., Morgan, H.J.A., and Harding, A.E. 1991. Mitochondrial encephalopathies: Molecular genetic diagnosis from blood samples. *Lancet* 337:1311–1313.

Hanenberg, H., Xiao, X.L., Dilloo, D., Hashino, K., Kato, I., and Williams, D.A. 1996. Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases

genetic transduction of mammalian cells. *Nat. Med.* 2:876–882.

Harrison, C.J. 1992. The lymphomas and chronic lymphoproliferative disorders. *In* Human Cytogenetics: A Practical Approach (D.E. Rooney and B.H. Czepulkowski, eds.) pp. 97–120. IRL Press, Oxford.

Haseman, J.K. and Elston, R.C. 1972. The investigation of linkage between a quantitative trait and a marker locus. *Behav. Genet.* 2:3–19.

Hastbacka, J., De La Chapelle, A., Kaitila, I., Sistonen, P., Weaver, A., and Lander, E. 1992. Linkage disequilibrium mapping in isolated founder populations: Diastrophic dysplasia in Finland. *Nat. Genet.* 2:204–211.

He, T.C., Zhou, S., da Costa, L.T., Yu, J., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. 1998. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:2509–2514.

Heiniger, H.J., Taylor, B.A., Hard, E.J., and Meier, H. 1975. Heritability of the phytohemagglutinin responsiveness of lymphocytes and its relationship to leukemogenesis. *Cancer Res.* 35:825–831.

Heng, H.H.Q. and Tsui, L.-C. 1994. Free chromatin mapping by FISH. *In* Methods of Molecular Biology: In Situ Hybridization Protocols (K.H.A. Choo, ed.) pp. 109–122. Humana Press, Clifton, N.J.

Henke, J., Fimmers, R., Baur, M.P., and Henke, L. 1993. DNA minisatellite mutations: Recent investigations concerning distribution and impact on parentage testing. *Int. J. Leg. Med.* 105:217–222.

Hentemann, M., Reiss, J., Wagner, M., and Cooper, D.N. 1990. Rapid detection of deletions in the Duchenne muscular dystrophy gene by PCR amplification of deletion-prone exon sequences. *Hum. Genet.* 84:228–232.

Herman, J.G., Graff, J.R., Myohanen, S., Nelkin, B.D., and Baylin, S.B. 1996. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:9821–9826.

Hirschhorn, J.N., Lohmueller, K., Byrne, E., and Hirschhorn, K. 2002. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet. Med.* 4:45–61.

Hitt, M.M., Addison, C.L., and Graham, F.L. 1997. Human adenovirus vectors for gene transfer into mammalian cells. *Adv. Pharmacol.* 40:137–206.

Hogan, B., Beddington, R., Costaatini, F., and Lacy, E. 1994. Manipulating the Mouse Embryo, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Houwen, R.H.J., Baharloo, S., Blankenship, K., Raeymaekers, P., Juyn, J., Sandkuijl, A., and Freimer, N.B. 1994. Genome screening by searching for shared segments: Mapping a gene for benign recurrent intrahepatic cholestasis. *Nat. Genet.* 8:380–386.

Hsu, T.M. and Kwok, P.-Y. 2003. Homogeneous primer extension assay with fluorescence polarization detection. *Methods Mol. Biol.* 212:177–187.

Hsu, L.Y.F., Kaffe, S., Jenkins, E.C., Alonso, L., Benn, P.A., David, K., Hirschorn, K., Lieber, E., Shanske, A., Shapiro, L.R., Schutta, E., and Warburton, D. 1992. Proposed guidelines for diagnosis of chromosome mosaicism in amniocytes based on data derived from chromosome mosaicism and pseudomosaicism studies. *Prenatal Diag.* 12:555–573.

Hsu, T.M., Chen, X., Duan, S., Miller, R., and Kwok, P.-Y. 2001. A universal SNP genotyping assay with fluorescence polarization detection. *BioTechniques* 31:560–570.

Huxley, C., Hagino, Y., Schlessinger, D., and Olson, M.V. 1991. The human HPRT gene on a yeast artificial chromosome is functional when transferred to mouse cells by cell fusion. *Genomics* 9:742–750.

Ioannou, P.A., Amemiya, C.T., Garnes, J., Kroisel, P.M., Shizuya, H., Chen, C., Batzer, M.A., and de Jong, P.J. 1994. A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat. Genet.* 6:84–89.

ISCN. 1981. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature—High-Resolution Banding (D.G. Harnden, J.E. Lindsten, K. Buckton, and H.P. Klinger, eds.). S. Karger, Basel, Switzerland.

ISCN. 1991. Guidelines for cancer cytogenetics, Supplement to An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (F. Mitelman, ed.). S. Karger, Basel.

ISCN. 1995. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (F. Mitelman, ed.). S. Karger, Basel, Switzerland, and Farmington, Conn.

Iyer, V.R., Eisen, M.B., Ross, D.T., Schuler, G., Moore, T., Lee, J.C.F. Trent, J.M., Staudt, L.M., Hudson, J. Jr., Boguski, M.S., Lashkari, D., Shalon, D., Botstein, D., and Brown, P.O. 1999. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science* 283:83–87.

Jaffe, E.S., Harris, N.L., Stein, H., and Vardiman, J.W. 2001. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press, Washington, D.C.

Kallioniemi, O.P., Kallioniemi, A., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J., Waldman, F., and Pinkel, D. 1993. Comparative genomic hybridization: A rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors. *Sem. Cancer Biol.* 4:41–46.

Kallioniemi, O.P., Kallioniemi, A., Piper, J., Isola, J., Waldman, F.M., Gray, J.W., and Pinkel, D. 1994. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chrom. Cancer* 10:231–243.

Kanesha, M. et al. 2002. The KEGG databases at GenomeNet. *Nucl. Acids Res.* 30:42–46.

Kans, J.A. and Ouellette, B.F.F. 1998. Submitting DNA sequences to the databases. *In* Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins (A.D. Baxevanis and B.F.F. Ouellette, eds.) pp. 319–353. John Wiley & Sons, New York.

Kao, F.-T., Jones, C., and Puck, T.T. 1976. Genetics of somatic mammalian cells: Genetic, immunologic, and biochemical analysis with Chinese hamster cell hybrids containing selected human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73:193–197.

Karlin, S. and Altschul, S.F. 1990. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 87:2264–2268.

Karlin, S. and Altschul, S.F. 1993. Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 90:5873–5877.

Kawaja, M.D., Fisher, L.J., Schinstine, M., Jinnah, H.A., Ray, J., Chen, L.S., and Gage, F.H. 1992. Grafting genetically modified cells within the rat central nervous system: Methodological considerations. *In* Neural

Transplantation: A Practical Approach (S.B. Dunnett and A. Bjorklund, eds.) pp. 20–55. Oxford University Press, New York.

Keightly, J.A., Hoffbuh, K.C., Burton, M.D., Salas, V.M., Johnston, W.S.W., Penn, A.M.W., Buist, N.R.M., and Kennaway, N.G. 1996. A microdeletion in cytochrome *c* oxidase (COX) subunit III associated with COX deficiency and recurrent myoglobulinuria. *Nat. Genet.* 12:410–415.

Kellems, R.E., (ed.) 1993. Gene Amplification in Mammalian Cells. Marcel Dekker, New York.

Kent, W.J. 2002. BLAT—The BLAST-like alignment tool. *Genome Res.* 12:656–664.

Kerr, M.K. and Churchill, G.A. 2001. Statistical design and the analysis of gene expression microarrays. *Genet. Res.* 77:123–128.

Kerr, M.K., Martin, M., and Churchill, G.A. 2000. Analysis of variance for gene expression microarray data. *J. Comput. Biol.* 7:819–837.

Khoury, M.J., Beaty, T.H. and Cohen, B.H. 1993. Fundamentals of Genetic Epidemiology, Chapters 7 and 8. Oxford University Press, New York.

Kilimann, M.K., Pizzuti, A., Grompe, M., and Caskey, C.T. 1992. Point mutations and polymorphisms in the human dystrophin gene identified in genomic DNA sequences amplified by multiplex PCR. *Hum. Genet.* 89:253–258.

Klinger, K., Landes, G., Shook, D., Harvey, R., Lopez, L., Locke, P., Lerner, T., Osathanondh, R., Leverone, B., Houseal, T., Pavelka, K., and Dackowski, W. 1992. Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Am. J. Hum. Genet.* 51:55–65.

Knuutila, S., Nylund, S.J., Wessman, M., and Larramendy, M.L. 1994a. Analysis of genotype and phenotype on the same interphase or mitotic cell. A manual of MAC (Morphology Antibody Chromosomes) methodology. *Cancer Genet. Cytogenet.* 72:1–15.

Koenig, M., Beggs, A.H., Moyer, M., Scherpf, S., Heindrich, K., Bettecken, T., Meng, G., Muller, C.R., Lindlof, M., Kaariainen, H., de la Chapelle, A., Kiuru, A., Savontaus, M.-L., Gilgenkrantz, H., Recan, D., Chelly, J., Kaplan, J.-C., Covone, A.E., Archidiacono, N., Romeo, G., Liechti-Gallati, S., Schneider, V., Braga, S., Moser, H., Darras, B.T., Murphy, P., Francke, U., Chen, J.D., Morgan, G., Denton, M., Greenberg, C.R., van Ommen, G.J.B., and Kunkel, L.M. 1989. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: Correlation of severity with type of deletion. *Am. J. Hum. Genet.* 45:498–506.

Kogan, S.C., Doherty, M., and Gitschies, J. 1987. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. *New Engl. J. Med.* 317:985–990.

Krisky, D.M., Marconi, P.C., Oligino, T.J., Rouse, R.J.D., Fink, D.J., Cohen, J.B., Watkins, S.C., and Glorioso, J.C. 1998. Development of herpes simplex virus replication-defective multigene vectors for combination gene therapy applications. *Gene Ther.* 5:1517–1530.

Kruglyak, L. and Lander, E.S. 1995. Complete multipoint sib-pair analysis of qualitative and quantitative traits. *Am. J. Hum. Genet.* 57:439–454.

Kubota, T., Das, S., Christian, S.L., Baylin, S.B., Herman, J.G., and Ledbetter, D.H. 1997. Methylation-specific PCR simplifies imprinting analysis. *Nat. Genet* 16:16–17.

Kunkel, L.M., Snyder, J.R., Beggs, A.H., Boyce, F.M., and Feener, C.A. 1991. Searching for dystrophin gene deletions in patients with atypical presentations. *In* Etiology of Human Diseases at the DNA Level (J. Lindsten and U. Petterson, eds.) pp. 51–60. Raven Press, New York.

Kurdi-Haidar, B., Levine, F., Roemer, K., LaPorte, P., and Friedmann, T. 1993. Provirus-anchored long range mapping of mammalian genomes. *Genomics* 15:305–310.

Kwok, P.-Y. 2002. SNP genotyping with fluorescence polarization detection. *Hum. Mutat.* 19:315–323.

Labarca, C. and Paigen, K. 1980. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Biochem.* 102:344–352.

Landegren, U., Nilsson, M., and Kwok, P.Y. 1998. Reading bits of genetics information: Methods for single-nucleotide polymorphism analysis. *Genome Res.* 8:769–776.

Lander, E.S. and Botstein, D. 1987. Homozygosity mapping: A way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science* 236:1567–1570.

Larsen, L.A., Christiansen, M., Vuust, J., and Andersen, P.S. 1999. High-throughput single-strand conformation polymorphism analysis by automated capillary electrophoresis: Robust multiplex analysis and pattern-based identification of allelic variants. *Hum. Mutat.* 13:318–327.

Latt, S.A. 1976. Optical studies of metaphase chromosome organization. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 5:1–37.

Latt, S.A., Shreck, R.R., D'Andrea, A., Kaiser, T.N., Schlesinger, F., Lester, S., and Sakai, K. 1984. Detection, significance, and mechanism of sister chromatid formation: Past experiments, current concepts, future challenges. *In* Sister Chromatid Exchanges (R.R. Tice and A. Hollaender, eds.) pp. 11–40. Plenum, New York.

Lederer, C.M., Hollander, J.M., and Perlman, I., (eds.). 1967. Table of Radioisotopes, 6th ed. John Wiley & Sons, New York.

Lee, E.C. 1991. Cytogenetic analysis of continuous cell lines. *In* The ACT Cytogenetics Laboratory Manual, 2nd ed. (M.J. Barch, ed.) pp. 107–148. Raven Press, New York.

Lee, J.L., Warburton, D., and Robertson, E.J. 1990. Cytogenetic methods for the mouse: Preparation of chromosomes, karyotyping, and in situ hybridization. *Anal. Biochem.* 189:1–17.

Lenk, U., Hanke, R., and Speer, A. 1994. Carrier detection in DMD families with point mutations using PCR-SSCP and direct sequencing. *Neuromusc. Dis.* 4:411–418.

Lichter, P., Cremer, T., Borden, J., Manuelidis, L., and Ward, D.C. 1988. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridisation using recombinant DNA libraries. *Hum. Genet.* 80:224–234.

Lichter, P., Tang, C.C., Call, K., Hermanson, G., Evans, G., Housman, D., and Ward, D.C. 1990. High-resolution mapping of human chromosome 11 by in situ hybridization with cosmid clones. *Science* 247:64–69.

Lindblad-Toh, K., Winchester, E., Daly, M.J., Wang, D.G., Hirschhorn, J.N., Laviolette, J.P., Ardlie, K., Reich, D.E., Robinson, E., Sklar, P., Shah, N., Thomas, D., Fan, J.B., Gingeras, T., Warrington, J., Patil, N., Hudson, T.J., and Lander, E.S. 2000. Large-scale discovery and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the mouse. *Nat. Genet.* 24:381–386.

Litt, M. and Luty, J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed

by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44:397–401.

Lockhart, D.J., Dong, H., Byrne, M.C., Follettie, M.T., Gallo, M.V., Chee, M.S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H., and Brown, E.L. 1996. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat. Biotechnol.* 14:1675–1680.

Look, A.T., Hayes, F.A., Shuster, J.J., Douglass, E.C., Castleberry, R.P., Bowman, L.C., Smith, E.I., and Brodeur, G.M. 1991. Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: A Pediatric Oncology Group study. *J. Clin. Oncol.* 9:581–591.

Maddalena, A., Richards, C.S., McGinniss, M.J., Brothman, A., Desnick, R.J., Grier, R.E., Hirsch, B., Jacky, P., McDowell, G.A., Popovich, B., Watson, M., and Wolff, D.J. 2001. Technical standards and guidelines for fragile X: The first of a series of disease-specific supplements to the standards and guidelines for clinical genetics laboratories of the American College of Medical Genetics. *Genet. in Med.* 3:200–205.

Madej, T., Gibrat, J.-F., and Bryant, S. 1995. Threading a database of protein cores. *Proteins* 23:356–369.

Magenis, E. and Barton, S.J. 1987. Delineation of human prometaphase paracentromeric regions using sequential GTG- and C-banding. *Cytogenet. Cell Genet.* 45:132–140.

Mahadevan, M., Tsilfidis, C., Sabourin, L., Shutler, G., Amemiya, C., Jansen, G., Neville, C., Narang, M., Barcelo, J., O'Hoy, K., Leblond, S., Earle-MacDonald, J., De Jong, P.J., Wieringa, B., and Korneluk, R. 1992. Myotonic dystrophy mutation: An unstable CTG repeat in the 3′ untranslated region of the gene. *Science* 255:1253–1255.

Mandahl, N. 1992. Methods in solid tumor cytogenetics. *In* Human Cytogenetics: A Practical Approach (D.E. Rooney and B.H. Czepulkowski, eds.) pp. 155–188. IRL Press, Oxford.

Mann, R., Mulligan, R.C., and Baltimore, D. 1983. Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* 33:153–159.

Markowitz, D., Goff, S., and Bank, A. 1988a. A safe packaging line for gene transfer: Separating viral genes on two different plasmids. *J. Virol.* 62:1120–1124.

Markowitz, D., Goff, S., and Bank, A. 1988b. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology* 167:400–406.

Martin, E.R., Monks, S.A., Warren, L.L., and Kaplan, N.L. 2000. A test for linkage and association in general pedigrees: The pedigree disequilibrium test (PDT). *Am. J. Hum. Genet.* 67:146–154.

Mayeux, R., Saunders, A., Shea, S., Mirra, S., Evans, D., Roses, A., Hyman, B., Crain, B., Tang, M.-X., and Phelps, C. 1998. Utility of the apolipoprotein E genotype in the diagnosis of Alzheimer's disease. *New Engl. J. Med.* 338:506–511.

McPherson, J.D., Marra, M., Hillier, L., et al. 2001. A physical map of the human genome. *Nature* 409:934–941.

Meng, G., Kress, W., Scherpf, S., Bettecken, T., Feichtinger, W., Schempp, W., Schmid, M., and Muller, C.R. 1991. A comparison of the dystrophin gene structure in primates and lower vertebrates. *In* Muscular Dystrophy Research: From Molecular Diagnosis Toward Therapy (C. Angelini, G.A. Danieli, and D. Fontanari, eds.) pp. 23–30. Excerpta Medica, New York.

Mies, C. 1994. Molecular biological analysis of paraffin-embedded tissues. *Hum. Pathol.* 25:555–560.

Miller, A.D. 1990. Retrovirus packaging cells. *Hum. Gene Ther.* 1:5–14.

Miller, A.D. and Buttimore, C. 1986. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol. Cell. Biol.* 6:2895–2902.

Miller, A.D. and Chen, F.C. 1996. Retrovirus packaging cells based on 10A1 murine leukemia virus for production of vectors that use multiple receptors for cell entry. *J. Virol.* 70:5564–5571.

Miller, G. and Lipman, M. 1973. Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leucocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70:190–194.

Miller, A.D. and Rosman, G.J. 1989. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques* 7:980–990.

Miller, A.D., Garcia, J.V., von Suhr, N., Lynch, C.M., Wilson, C., and Eiden, M.V. 1991. Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J. Virol.* 65:2220–2224.

Mir, L.M., Bureau, M.F., Gehl, J., Rangara, R., Rouy, D., Caillaud, J.M., Delaere, P., Branelle, D., Schwartz, B., and Scherman, D. 1999. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:4262–4267.

Mitelman, F. 1991. Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer. Wiley-Liss, New York.

Miyanohara, A., Yee, J.K., Bouic, K., LaPorte, P., and Friedmann, T. 1995. Efficient in vivo transduction of the neonatal mouse liver with pseudotyped retroviral vectors. *Gene Ther.* 2:138–142.

Moore, K.A., Deisseroth, A.B., Reading, C.L., Williams, D.E., and Belmont, J.W. 1992. Stromal support enhances cell-free retroviral vector transduction of human bone marrow long-term culture-initiating cells. *Blood* 79:1393–1399.

Morgenstern, J.P. and Land, H. 1990. Advanced mammalian gene transfer: High titer retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucl. Acids Res.* 18:3587–3596.

Morris, J. 1993. Application of genetic testing to disputed paternity. *Clin. Chem.* 39:716–717.

Morris, J.W., Sanda, A.I., and Glassberg, J. 1989. Biostatistical evaluation from continuous allele frequency distribution deoxyribonucleic acid (DNA) probes in reference to disputed paternity and identity. *J. Forensic Sci.* 34:1311–1317.

Murray, V. 1989. Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucl. Acids Res.* 17:8889.

National Research Council [NRC (U.S.); Committee on Hazardous Biological Substances in the Laboratory]. 1989. Biosafety in the Laboratory: Prudent Practices for the Handling and Disposal of Infectious Materials. National Academy Press, Washington, D.C.

Negrin, R.S. and Blume, K.G. 1991. The use of polymerase chain reaction for the detection of minimal residual malignant disease. *Blood* 78:255–258.

Nelson, D.L., Ledbetter, S.A., Corbo, L., Victoria, M.F., Ramirez-Solis, R., Webster, T.D., Ledbetter, D.H., and Caskey, C.T. 1989. *Alu* polymerase chain reaction: A method for rapid isolation of human-specific sequences from complex DNA

sources. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:6686–6690.

Nelson, M.R., Kardia, S.L.R., Ferrell, R.E., and Sing, C.F. 2001. A combinatorial partitioning method (CPM) to identify multi-locus genotypic partitions that predict quantitative trait variations. *Genome. Res.* 11:458–470.

Newton, C.R., Graham, A., Heptinstall, L.E., Powell, S.J., Summers, C., Kalsheker, N., Smith, J., and Markham, A.F. 1989. Analysis of any point mutation in DNA: The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucl. Acid Res.* 17:2503–2516.

Nickerson, D.A., Kaiser, R., Lappin, S., Stewart, J., Hood, L., and Landegren, U. 1990. Automated DNA diagnostics using an ELISA-based oligonucleotide ligation assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:8923–8927.

Nickerson, D.A., Tobe, V.O., and Taylor, S.L. 1997. PolyPhred: Automating the detection and genotyping of single nucleotide substitutions using fluorescence-based resequencing. *Nucl. Acids Res.* 25:2745–2751.

Nolta, J.A., Dao, M.A., Wells, S., Smogorzewska, E.M., and Kohn, D.B. 1996. Transduction of pluripotent human hematopoietic stem cells demonstrated by clonal analysis after engraftment in immune-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93:2414–2419.

Osoegawa, K., Woon, P.-Y., Zhao, B., Frengen, E., Tateno, M., Catanese, J.J., and de Jong, P.J. 1998. An improved approach for construction of bacterial artificial chromosome libraries. *Genomics* 52:1–8.

Ott, J. 1999. Analysis of Human Genetic Linkage, 3rd ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore.

Parentage Testing Accreditation Requirements Manual, 2nd ed. 1995. American Association of Blood Banks, Bethesda, Md.

Parra, I. and Windle, B. 1993. High resolution visual mapping of stretched DNA by fluorescent hybridization. *Nat. Genet.* 5:17–21.

Pavan, W.J., Hieter, P., and Reeves, R.H. 1990. Modification and transfer into an embryonal carcinoma cell line of a 360-kilobase human-derived yeast artificial chromosome. *Mol. Cell. Biol.* 10:4163–4169.

Paxinos, G. and Watson, C. 1986. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, San Diego.

Paxinos, G., Ashwell, K.W.S., and Tork, I. 1994. Atlas of the Developing Rat Nervous System. Academic Press, San Diego.

Pear, W.S., Nolan, G.P., Scott, M.L., and Baltimore, D. 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:8392–8396.

Pechan, P.A., Fotaki, M., Thompson, R.L., Dunn, R.J., Chase, M., Chiocca, E.A., and Breakefield, X.O. 1996. A novel "piggyback" packaging system for herpes simplex virus amplicon vectors. *Hum. Gene Ther.* 7:2003–2013.

Perry, P. and Wolff, S. 1974. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 257:156–158.

Pinkel, D., Landegent, J., Collins, C., Fuscoe, J., Segraves, R., Lucas, J., and Gray, J.W. 1988. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:9138–9142.

Priest, J.H. 1991. Prenatal chromosome diagnosis and cell culture. *In* The ACT Cytogenetics Laboratory Manual, 2nd ed. (M.J. Barch, ed.) pp. 149–204. Raven Press, New York.

Prior, T.W., Bartolo, C., Pearl, D.K., Papp, A.C., Snyder, P.J., Sedra, M.S., Burghes, A.H.M., and Mendell, J.R. 1995. Spectrum of small mutations in the dystrophin coding region. *Am. J. Hum. Genet.* 57:22–33.

Pritchard, J.K., Stephens, M., Rosenberg, N.A., and Donnelly, P. 2000. Association mapping in structured populations. *Am. J. Hum. Genet.* 67:170–181.

Rabinowitz, D. and Laird, N. 2000. A unified approach to adjusting association tests for population admixture with arbitrary pedigree structure and arbitrary missing marker information. *Hum. Hered.* 50:211–223.

Ranade, K., Chang, M.-S., Ting, C.-T., Pei, D., Hsiao, C.-F., Olivier, M., Pesich, R., Hebert, J., Chen, Y.-I., Dzau, V.J., Curb, D., Olshen, R., Risch, N., Cox, D.R., and Botstein, D. 2001. High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. *Genome Res.* 11:1262–1268.

Rasty, S., Goins, W.F., and Glorioso, J.C. 1995. Site-specific integration of multigenic shuttle plasmids into the herpes simplex virus type 1 genome using a cell-free Cre-*lox* recombination system. *Methods Mol.Genet.* 7:114–130.

Richards, B., Skoletsky, J., Shuber, A., Balfour, R., Stern, R., Dorkin, H., Parad, R., Witt, D., and Klinger, K. 1994. Multiplex PCR amplification from the *CFTR* gene using DNA prepared from buccal brushes/swabs. *Hum. Mol. Genet.* 2:159–163.

Risch, N. 1990. Linkage strategies for genetically complex traits. I. Multilocus models. *Am. J. Hum. Genet.* 16:222–228.

Ritchie, M.D., Hahn, L.W., Roodi, N., Bailey, L.R., Dupont, W.D., Parl, F.F., and Moore, J.H. 2001. Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer. *Am. J. Hum. Genet.* 69:138–147.

Roberts, R.G., Montandon, A.J., Bobrow, M., and Bently, D.R. 1989. Detection of novel genetic markers by mismatch analysis. *Nucl. Acids Res.* 17:5961–5971.

Roberts, R.G., Bobrow, M., and Bentley, D.R. 1992. Point mutations in the dystrophin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:2331–2335.

Roest, P.A.M., Roberts, R.G., Sugino, S., van Ommen, G.J.B., and den Dunnen, J.T. 1993. Protein truncation test (PTT) for rapid detection of translation-terminating mutations. *Hum. Mol. Genet.* 2:1719–1721.

Rogic, S., Mackworth, A., and Ouellette, B.F.F. 2001. Evaluation of gene-finding programs on mammalian sequences. *Genome Res* 11:817–832.

Rooney, D.E. and Czepalkowski, B.H. Prenatal diagnosis and tissue culture. 1992. *In* Human Cytogenetics: A Practical Approach, 2nd ed., Vol. 1 (D.E. Rooney and B.H. Czepalkowski, eds.) pp. 55–89. IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

Rousseau, F., Heitz, D., Biancalana, V., Blumenfeld, S., Kretz, C., Bou, J., Tommerup, N., Van Der Hagen, C., DeLozier-Blanchet, C., Croquette, M.-F., Gilgenkrantz, S., Jalbert, P., Voelckel, M.-A., Oberl, I., and Mandel, J.-L. 1991. Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *New Engl. J. Med.* 325:1673–1681.

Sahar, E. and Latt, S.A. 1980. Energy transfer and binding competition between dyes used to enhance staining differentiation in metaphase chromosomes. *Chromosoma* 79:1–28.

Sakuraba, H., Ishii, K., Shimmoto, M., Yamada, H., and Suzuki, Y. 1991. A screening for dystrophin gene deletions in Japanese patients with

Duchenne/Becker muscular dystrophy by the multiplex polymerase chain reaction. *Brain Dev.* 13:339–342.

Samaniego, L.A., Neiderhiser, L., and DeLuca, N.A. 1998. Persistence and expression of the herpes simplex virus genome in the absence of immediate-early proteins. *J. Virol.* 72:3307–3320.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Samulski, R.J., Sally, M., and Muzyczka, N. 1999. Adeno-associated viral vectors. *In* The Development of Human Gene Therapy (T. Friedman, ed.) pp. 36:131–172. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sandberg, A.A. 1990. The Chromosomes in Human Cancer and Leukemia, 2nd ed. Elsevier, New York.

Santorelli, F.M., Shanske, S., Macaya, A., DeVivo, D.C., and DiMauro, S. 1993. The mutation at nt 8993 of mitochondrial DNA is a common cause of Leigh's syndrome. *Ann. Neurol.* 34:827–834.

Santorelli, F.M., Suk-Chun, M., Vasquez-Acevedo, M., Gonzalez-Astiazarin, A., Ridaura-Sanz, C., Gonzalez-Halphen, D., and DiMauro, S. 1995. A novel mitochondrial DNA point mutation associated with mitochondrial encephaolcardiomyopathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216:835–840.

Santorelli, F.M., Schlessel, J.S., Slonim, A.E., and DiMauro, S. 1996. Novel mutation in the mitochondrial DNA tRNA glycine gene associated with sudden unexpected death. *Ped. Neurol.* 15:145–149.

Sawyer J.R., Moore, M.M., and Hozier, J.C. 1987. High resolution G-banded chromosomes of the mouse. *Chromosoma (Berl)* 95:350–358.

Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., and Brown, P.O. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270:467–470.

Schofield, D.E. and Fletcher, J.A. 1992. Trisomy 12 in pediatric granulosa-stromal cell tumors: Demonstration by a modified method of fluorescence in situ hybridization on paraffin-embedded material. *Am. J. Path.* 141:1265–1269.

Schröck, E., du Manoir, S., Veldman, T., Schoell, B., Wienberg, J., Ferguson-Smith, M.A., Ning, Y., Ledbetter, D.H., Bar-Am, I., Soenksen, D., Garini, Y., and Ried, T. 1996. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273:494–496.

Schwartz, D.C. and Cantor, C.R. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37:67–75.

Schweitzer, D. 1981. Counterstain enhanced chromosome banding. *Hum. Genet.* 57:1–14.

Scriver, C.R., Nowacki, P.M., and Lehvaslaiho, H. 1999. Guidelines and recommendations for content, structure, and deployment of mutation databases. *Hum. Mutat.* 13:344–350.

Scriver, C.R., Nowacki, P.M., and Lehvaslaiho, H. 2000. Guidelines and recommendations for content, structure, and deployment of mutation databases. II. Journey in progress *Hum. Mutat.* 15:13–15.

Shenk, T. 1996. Adenoviridae: The viruses and their replication. *In* Fields Virology (B.N. Fields, D.M. Kulpe, P.M. Howley, R.M. Chanok, J.L. Melnick, T.P. Monath, B. Roizman, and S.E. Straus, eds.) pp. 2111–2148. Lippincott, Philadelphia.

Shiver, J.W., Fu, T.M., Chen, L., Casimiro, D.R., Davies, M.E., Evans, R.K., Zhang, Z.Q., Simon, A.J., Trigona, W.L., Dubey, S.A., Huang, L., Harris, V.A., Long, R.S., Liang, X., Handt, L., Schleif, W.A., Zhu, L., Freed, D.C., Persaud, N.V., Guan, L., Punt, K.S., Tang, A., Chen, M., Wilson, K.A., Collins, K.B., Heidecker, G.J., Fernandez, V.R., Perry, H.C., Joyce, J.G., Grimm, K.M., Cook, J.C., Keller, P.M., Kresock, D.S., Mach, H., Troutman, R.D., Isopi, L.A., Williams, D.M., Xu, Z., Bohannon, K.E., Volkin, D.B., Montefiori, D.C., Miura, A., Krivulka, G.R., Lifton, M.A., Kuroda, M.J., Schmitz, J.E., Letvin, N.L., Caulfield, M.J., Bett, A.J., Youil, R., Kaslow, D.C., and Emini, E.A. 2002. Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature* 415:331–335.

Shizuya, H., Birren, B., Kim, U.-J., Mancino, V., Stepak, T., Tachiiri, Y., and Simon, M. 1992. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an f-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:8794–8797.

Shleien, B., (ed.) 1987. Radiation Safety Manual for Users of Radioisotopes in Research and Academic Institutions. Nucleon Lectern Associates, Olney, Md.

Shoffner, J.M. and Wallace, D.C. 1995. Oxidative phosphorylation diseases. *In* The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, and D. Valle, eds.) pp. 1535–1610. McGraw-Hill, New York.

Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R.P., and Canaani, E. 1985. Fused transcripts of *abl* and *bcr* genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* 315:550–554.

Shuber, A.P., Skoletsky, J., Stern, R., and Handelin, B.L. 1992. Efficient 12-mutation testing in the CFTR gene: A general model for complex mutation analysis. *Hum. Molec. Genet.* 2:159–163.

Shuber, A.P., Michalowsky, L.A., Nass, G.S., Skoletsky, J., Hire, L.M., Kotsopoulos, S.K., Phipps, M.F., Barberio, D.M., and Klinger, K.W. 1997. High throughput parallel analysis of hundreds of patient samples for more than 100 mutations in multiple disease genes. *Hum. Mol. Genet.* 6:337–47.

Sikorski, R.S. and Hieter, P. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *S. cerevisiae*. *Genetics* 122:19–27.

Silvestri, G., Servidel, S., Ranas, M., Ricci, E., Spinazzola, A., Paris, E., and Tonall, P. 1996. A novel mitochondrial DNA point mutation in the $tRNA^{Ile}$ gene is associated with progressive external ophthalmoplegia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220:622–627.

Simari, R.D., San, H., Rekhter, M., Ohno, T., Gordon, D., Nabel, G.J., and Nabel, E.G. 1996. Regulation of cellular proliferation and intimal formation following balloon injury in atherosclerotic rabbit arteries. *J. Clin. Invest* 98:225–235.

Sklar, J. 1992. Antigen receptor genes: Structure, function, and techniques for analysis of their rearrangements. *In* Neoplastic Hematopathology (D.M. Knowles, ed.) pp. 215–244. Williams & Wilkens, Baltimore.

Smith, D.R. 1990. Genomic long-range restriction mapping. *Methods* 1:195–203.

Smith, I.L., Hardwicke, M.A., and Sandri-Goldin, R.M. 1992. Evidence that the herpes simplex virus immediate-early protein ICP27 acts

post-transcriptionally during infection to regulate gene expression. *Virology* 186:74–86.

Snyder, E.E. and Stormo, G.D. 1993. Identification of coding regions in genomic DNA sequences: An application of dynamic programming and neural networks. *Nucl. Acids Res* 21:607–613.

Snyder, E.E. and Stormo, G.D. 1997. Identifying genes in genomic DNA sequences. *In* DNA and Protein Sequence Analysis (M.J. Bishop and C.J. Rawlings, eds.) pp. 209–224. Oxford University Press, New York.

Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503–517.

Spaete, R.R. and Frenkel, N. 1982. The herpes simplex virus amplicon: A new eucaryotic defective-virus cloning-amplifying vector. *Cell* 30:295–304.

Speel, E.J.M., Schutte, B., Wiegant, J., Ramaekers, F.C., and Hopman, A.H.N. 1992. A novel fluorescence detection method for in situ hybridization, based on the alkaline phosphatase-fast red reaction. *J. Histochem. Chytochem.* 40:1299–1308.

Speer, A., Rosenthal, A., Billwitz, H., Hanke, R., Forrest, S.M., Love, D., Davies, K.E., and Coutelle, C. 1989. DNA amplification of a further exon of Duchenne muscular dystrophy locus increase possibilities for deletion screening. *Nucl. Acids Res.* 17:4892.

Speicher, M.R., Ballard, S.G., and Ward, D.C. 1996. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat. Genet.* 12:368–375.

Sternberg, N. 1990. Bacteriophage P1 cloning system for the isolation, amplification, and recovery of DNA fragments as large as 100 kilobase pairs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:103–107.

Sumner, A.T. 1990. Chromosome Banding. Unwin Hyman, London.

Sumner, A.T., and Evans, H.J. 1973. Mechanism involved in the banding of chromosomes with quinicrine and Giemsa. II. The interaction of the dyes with the chromosomal components. *Exp. Cell Res.* 81:223–236.

Takahara, Y., Hamada, K., and Housman, D.E. 1992. A new retrovirus packaging cell for gene transfer constructed from amplified long terminal repeat-free chimeric proviral genes. *J. Virol.* 66:3725–3732.

Taylor, R.W., Chinney, P.F., Haldane, F., Morris, A.A.M., Bindoff, L.A., Wilson, J., and Turnbull, D.M. 1996. MELAS associated with a mutation in the valine transfer RNA gene of mitochondrial DNA. *Ann. Neuorol.* 40:459–462.

Terwilliger, J.D. and Ott, J. 1994. Handbook of Human Genetic Linkage. Johns Hopkins University Press, Baltimore.

Theune, S., Fung, J., Todd, S., Sakaguchi, A.Y., and Naylor, S.L. 1991. PCR primers for human chromosomes: Reagents for the rapid analysis of somatic cell hybrids. *Genomics* 9:511–516.

Thomas, P.S. 1980. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:5201–5205.

Traver, M. 1996. Promega Statistics Workshop, Scottsdale, Ariz.

Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., Parker, S.E., Rhodes, G.H., Felgner, P.L., Dwarki, V.J., Gromkowski, S.H., Deck, R.R., De Witt, C.M., Friedman, A., Hawe, L., Leander, K.R., Martinez, D., Perry, H.C., Shiver, J.W., Montgomery, D.L., and Liu, M.A. 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259:1745–1749.

Verlinsky, Y. and Cieslak, J. 1993. Embryological and technical aspects of preimplantation genetic diagnosis. *In* Preimplantation Diagnosis of Genetic Diseases. A New Technique in Assisted Reproduction (Y. Verlinsky and A.M. Kuliev, eds.) pp. 49–67. Wiley-Liss, New York.

Vollrath, D. and Davis, R.W. 1987. Resolution of DNA molecules greater than 5 megabases by contour-clamped homogeneous electric fields. *Nucl. Acids Res.* 15:7865–7876.

Wallace, D.M. 1987. Precipitation of nucleic acids. *Methods Enzymol.* 152:41–48.

Wallace, R.B., and Miyada C.G. 1987. Oligonucleotide probes for the screening of recombinant DNA libraries. *Methods Enzymol.* 152:432–442.

Wallace, D.C. Lott, M.T. Brown, M.D., Huoponen, K., and Torroni, A. 1995. Report of the committee on human mitochondrial DNA. *In* Human Gene Mapping 1994, a Compendium (A.J. Cuticchia, ed.) pp. 910–954. Johns Hopkins University Press, Baltimore.

Wang, D.G., Fan, J.B., Siao, C.J., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., Ghandour, G., Perkins, N., Winchester, E., Spencer, J., Kruglyak, L., Stein, L., Hsie, L., Topaloglou, T., Hubell, E., Robinson, E., Mittman, M., Morris, M.S., Shen, N., Kilburn, D., Rioux, J., Nusbaum, C., Rozen, S., Hudson, T.J., Lipshutz, R., Chee, M., and Lander, E.S. 1998. Large-scale identification, mapping and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280:1077–1082.

Warburton, D., Gersen, S., Yu, M.-T., Jackson, C., Handelin, B., and Housman, D. 1990. Monochromosomal rodent-human hybrids from microcell fusion of human lymphoblastoid cells containing an inserted dominant selectable marker. *Genomics* 6:358–366.

Walz, T., Geisel, J., Bodis, M., Knapp, J.P., and Herrmann, W. 2000. Fluorescence-based single-strand conformation polymorphism analysis of mutations by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 21:375–379.

Weber, J.L. and May, P.E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44:388–396.

Webster, C., Pavlath, G.K., Parks, D.R., Walsh, F.S., and Blau, H.M. 1988. Isolation of human myoblasts with the fluorescence-activated cell sorter. *Exp. Cell Res* 174:252–65.

Weissenbach, J., Gyapay, G., Dib, C., Vignal, A., Morissette, J., Millasseau, P., Vaysseix, G., and Lathrop, M. 1992. A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* 359:794–801.

Welsh, P.S., Metzger, D.A., and Higuchi, R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA. *BioTechniqes* 10:506–513.

Wiedmann, M., Wilson, W.J., Czajka, J., Luo, J., Barany, F., and Batt, C.A. 1994. Ligase chain reaction (LCR)—Overview and applications. *PCR Methods Appl.* 3:S51–S64.

Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., and Felgner, P.L. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247:1465–1468.

Wolfsberg, T.G., Gabrielian, A.E., Campbell, M.J., Cho, R.J., Spouge, J.L., and Landsman, D. 1999. Candidate regulatory sequence

elements for cell cycle-dependent transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Res* 9:775–792.

Xiao, X., Li, J., and Samulski, R.J. 1998. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J. Virol.* 72:2224–2232.

Yang, Y., Vanin, E.F., Whitt, M.A., Fornerod, M., Zwart, R., Schneiderman, R.D., Grosveld, G., and Nienhuis, A.W. 1995. Inducible, high-level production of infectious murine leukemia retroviral vector particles pseudotyped with vesicular stomatitis virus G envelope protein. *Hum. Gene Ther.* 6:1203–1213.

Yang, Y.H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D.M., Peng, V., Ngai, J., and Speed, T.P. 2002. Normalization for cDNA microarray data: A robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucl. Acids Res* 4:e15.

Yee, J.K., Miyanohara, A., LaPorte, P., Bouic, K., Burns, J.C., and Friedmann, T. 1994. A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: Highly efficient infection of primary hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:9564–9568.

Zabner, J., Zeiher, B.G., Friedman, E., and Welsh, M.J. 1996. Adenovirus-mediated gene transfer to ciliated airway epithelia requires prolonged incubation time. *J. Virol.* 70:6994–7003.

Zhang, M.Q. 1997. Identification of protein coding regions in the human genome by quadratic discriminant analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94:565–568.

Zhang, J. and Madden, T.L. 1997. PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. *Genome Res.* 7:649–656.

Zhang, Z., Schaffer, A.A., Miller, W., Madden, T.L., Lipman, D.J., Koonin, E.V., and Altschul, S.F. 1998a. Protein sequence similarity searches using patterns as seeds. *Nucl. Acids Res.* 26:3986–3990.

索　引

[General Information]
书名=精编人类遗传学实验指南=SHORT PROTOCOLS IN HUMAN GENETICS
作者=（美）N？C？德拉科波利，J？L？海恩斯，B？R？科夫，C．C．莫顿，A．罗森茨威格，C．E．塞德曼，J．G．塞德曼，D．R．史密斯编著；夏家辉主译
页数=849
SS号=14076124
DX号=
出版日期=2016.07
出版社=科学出版社